



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Identificación de las proteínas Tom1 y Vps23 en Entamoeba  
histolytica”**

T E S I S

Que presenta:

**Q. B. P. Ausencio Galindo Olea**

Para obtener el grado de:

Maestro en ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular

Director de la Tesis

**Dra. María Esther Orozco Orozco**

**Ciudad de México**

**Agosto, 2016**

***“No tengo talentos especiales, pero sí soy  
profundamente curioso.”***

**Albert Einstein**

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) con el número de CVU 636226. En el Laboratorio 2 del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección de la Dra Ma. Esther Orozco Orozco.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra Ma. Esther Orozco Orozco por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su tutoría, estar siempre consiente del desarrollo del mismo y ser un ejemplo de lo que se puede lograr con esfuerzo y dedicación.

A mis asesores la Dra. Patricia Talamás Rohana, Dra Abigail Betanzos Fernández, y al Dr. José Luís Rosales Encina, por su apoyo, disposición, consejos y observaciones que enriquecieron este trabajo.

A las Doctoras Guillermina García, Miriam Huerta y Rosario Javier Reyna, gracias por su orientación para con este trabajo así como de su amistad.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por su orientación y amistad incondicional Jonnatan Pais, Maricela Montaña, Patricia Cuellar, Jeni Bolaños, Eli Hernández, Jessica Bordolla, Ravi Narayanssamy, Tomas Sánchez, Alejandrina Reyes, Rocio Guerrero. Han sido una parte muy importante en este trabajo.

A todos mis amigos y grandes compañeros de generación, por su forma tan peculiar de ser.

*Dedico este trabajo a mis padres,  
todo lo bueno que tengo se los debo  
a ustedes*

*También para ti Vanessa, gracias  
por tu comprensión y apoyo.*

## ABSTRACT

*Entamoeba histolytica* is responsible for at least 100,000 deaths a year worldwide. Its pathogenic potential is primarily related to three cellular mechanisms: adherence to the target cell, cytotoxicity and phagocytosis. The trophozoite, mobile and infective stage, has a very active remodeling of the plasma and internal membranes. This activity is essential to be carried out endocytosis. In eukaryotes, the ESCRT machinery (endosomal sorting complex required for transport) formed by ESCRT-0, -I, -II, -III complex; It is the central part of the remodeling of membranes. Our working group has found that *E. histolytica* has elements of machinery ESCRT-III as well as accessory proteins EhADH and EhVps4. It has further been shown the participation of these elements in the event of erythrophagocytosis and vesicular traffic. However, the contribution of ESCRT-0, -I, -II complex is unknown. Therefore, the objective of this work is to study the presence of proteins ESCRT-0 and ESCRT-I system and their participation in erythrophagocytosis. The bioinformatic analysis showed that the protein EhTom1, has a membrane interaction domain (VHS), and an additional domain that indicates a possible association with ubiquitin, suggesting that could fulfill a similar EhTom1 members ESCRT-0 role. By means of specific antibodies against a protein peptide found that complexes of 114, 73 and 60 kDa and located in the cytoplasm, giving its relocation from changes of 2 min initiated phagocytosis. As for the complex ESCRT-I in the genome of *E. histolytica* EhVps23 the gene for the protein is present. Using antibodies specific for determined EhVps23 having a weight of 62 kDa and which like EhTom1 has a cytoplasmic localization is affected during the event erythrophagocytosis being different between the two proteins.

## RESUMEN

*Entamoeba histolytica* es responsable de al menos 100,000 muertes al año en el mundo. Su potencial patogénico está relacionado principalmente a tres mecanismos celulares: adherencia a la célula blanco, citotoxicidad y fagocitosis. El trofozoíto, la fase móvil e infectiva, presenta una muy activa remodelación de sus membranas plasmáticas e internas. Esta actividad es indispensable para que se lleve a cabo la endocitosis. En eucariontes, la maquinaria ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) formada por los complejos ESCRT-0, -I, -II, -III; constituye la parte central de la remodelación de membranas. Nuestro grupo de trabajo ha encontrado que *E. histolytica* posee elementos de la maquinaria ESCRT-III además de proteínas accesorias como EhADH y EhVps4. Adicionalmente se ha mostrado la participación de estos elementos en el evento de eritrofagocitosis y tráfico vesicular. Sin embargo, se desconoce la contribución de los complejos ESCRT-0, -I, -II. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar la presencia de proteínas del sistema ESCRT-0 y ESCRT-I, así como su participación en la eritrofagocitosis. El análisis bioinformático mostró que la proteína EhTom1, posee un dominio (VHS) de interacción a membrana, y un motivo adicional que indica una posible asociación con ubiquitina, sugiriendo que EhTom1 podría cumplir un rol similar a los miembros del ESCRT-0. Por medio de anticuerpos específicos contra un péptido de la proteína, se encontró que forma complejos de 114, 73 y 60 kDa y se localiza en condiciones basales en el citoplasma, dándose cambios de su relocalización desde 2 min de iniciada la fagocitosis. En cuanto al complejo ESCRT-I, en el genoma de *E. histolytica* está presente el gen para la proteína EhVps23. Usando anticuerpos específicos para EhVps23 se determinó que tiene un peso de 62 kDa y que al igual que EhTom1 posee una localización citoplasmática que se ve afectada durante el evento de eritrofagocitosis, siendo diferente entre ambas proteínas.

## **I. Introducción**

### **1. Amebiasis**

La amibiasis es definida por la OMS como la infección del parásito protozoario *Entamoeba histolytica* la cual puede o no tener manifestaciones clínicas, se considera como la tercera causa de muertes relacionadas a infecciones parasitarias en el mundo (WHO, 1997). La amibiasis se caracteriza por una infección del tracto gastrointestinal por el parásito, éste es capaz de invadir la mucosa intestinal y de propagarse a otros órganos, entre ellos el hígado. Se calcula que anualmente existen 100 millones de casos de disentería amibiana, las complicaciones como la colitis y el absceso hepático generan un aproximado de 100,000 muertes al año (Mortimer & Chadee, 2010). La gran mayoría de estos casos se presentan en países en vías de desarrollo como: México, Sudamérica occidental, sur de Asia, sudoeste y oeste de África. A pesar de que la amibiasis ha presentado una disminución en el número de casos e incidencia en México, esta infección aún permanece entre las primeras causas de morbilidad por enfermedades transmisibles, de esta manera, paso de la 5° posición en el 2003 con una tasa de incidencia de 972 (por 100,000 habitantes) al 6° lugar en el 2008 y 2011, esto con una tasa de incidencia de 498 y 384 respectivamente (Sánchez-Garay & Mújica-Vargas, 2009; SUIVE, 2012).

### **2. Taxonomía de *Entamoeba histolytica***

Desde la descripción de *E. histolytica* como una entidad biológica capaz de producir manifestaciones clínicas en el humano su clasificación taxonómica ha sufrido gran cantidad de modificaciones. Debido a su estrecha relación (morfológica y bioquímica) con la amiba no patógena *Entamoeba dispar* no se clasificaron como especies distintas hasta 1993 (Diamond & Clark, 1993).

Las primeras clasificaciones taxonómicas se efectuaron tomando en cuenta características morfológicas y bioquímicas del parásito. La última clasificación toma en consideración características estructurales y genéticas, esta clasificación está indicada en la Tabla 1.



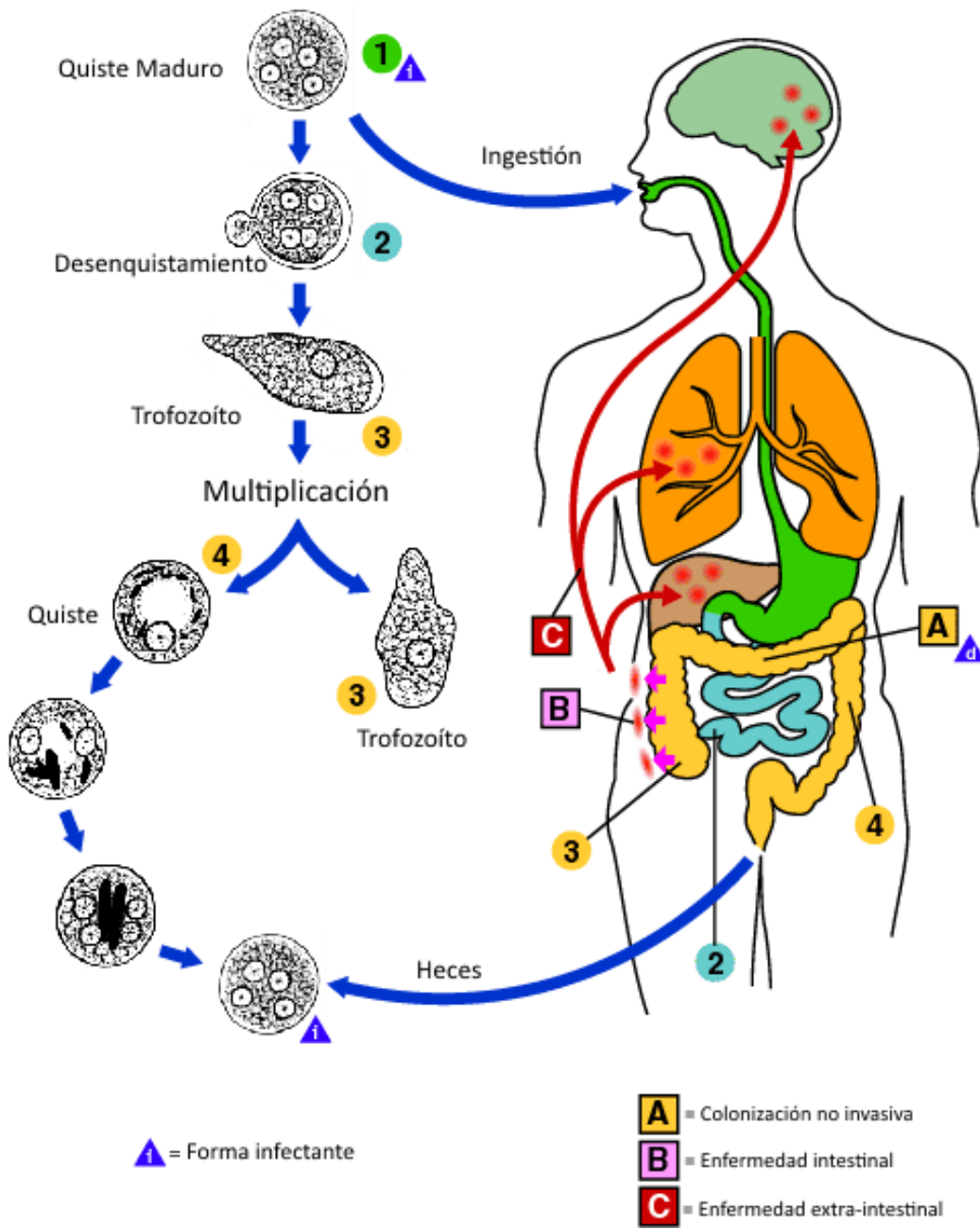
Tabla 1: Clasificación taxonómica actual de *E. histolytica*. (NCBI, 2015; UniProt, 2015)

Dominio	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Protozoa</i>
Phylum	<i>Amebozoa</i>
Subphylum	<i>Conosea</i>
Intraphylum	Archamoebae
Familia	<i>Entamoebidae</i>
Género	<i>Entamoeba</i>
Especie	<i>Entamoeba histolytica</i>

### 3. Ciclo de vida

Tal como se muestra en la Figura 1, el parásito es adquirido cuando se ingieren quistes infectivos o maduros (1) a través de alimentos o agua contaminada. El quiste es capaz de resistir las secreciones gástricas y pancreáticas, pero los cambios de pH permiten el reblandecimiento de la pared del quiste, lo que produce señales para la duplicación de los cuatro núcleos presentes. Finalmente, ocurre el desenquistamiento (2) a nivel de la porción final del intestino delgado (íleon), con lo que se liberan ocho formas parasitarias conocidas como trofozoítos (3). Estas formas móviles del parásito migran al intestino grueso donde se multiplican por fisión binaria. El enquistamiento se inicia cuando el trofozoíto avanza a través del intestino grueso y finaliza con la formación del quiste mononuclear (4). Como se mencionó anteriormente, debido a procesos de división nuclear se producen quistes tetra-nucleados. Trofozoítos y quistes son expulsados con las heces, los trofozoítos mueren en el medio ambiente, pero los quistes, debido a la protección que le confiere su pared pueden sobrevivir hasta dos semanas en el ambiente externo, sobre todo en climas húmedos.

Los quistes maduros son la forma infectante de la amiba, los trofozoítos en caso de ser ingeridos, no sobreviven al ambiente ácido de los jugos gástricos. Una vez que se produce el proceso de desenquistamiento en el tubo digestivo, en la gran mayoría de los casos los trofozoítos se mantienen en el lumen intestinal (infección



**Figura 1. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*.** El parásito protozoario *E. histolytica* es transmitido al humano principalmente por la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas con quistes maduros, en el humano se presenta el estadio de trofozoítos que es la forma móvil, las personas infectadas expulsan en sus heces quistes infectivos. Dependiendo de diversas condiciones puede llegar a causar una colonización no invasiva, enfermedad intestinal y/o enfermedad extraintestinal (CDC, 2015a; CDC, 2015b).

no invasiva) de los individuos, por lo que estos individuos no presentan sintomatología clínica, sin embargo, expulsan formas infectantes en las heces. En otros individuos los trofozoítos invaden la mucosa del tejido (enfermedad intestinal), o pueden, a través del flujo sanguíneo, invadir órganos extra-intestinales como hígado, cerebro y pulmones (enfermedad extra-intestinal). Tanto la forma intestinal como la extra-intestinal presentan manifestaciones clínicas (CDC, 2015b; Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000; Tanyuksel & Petri, 2003).

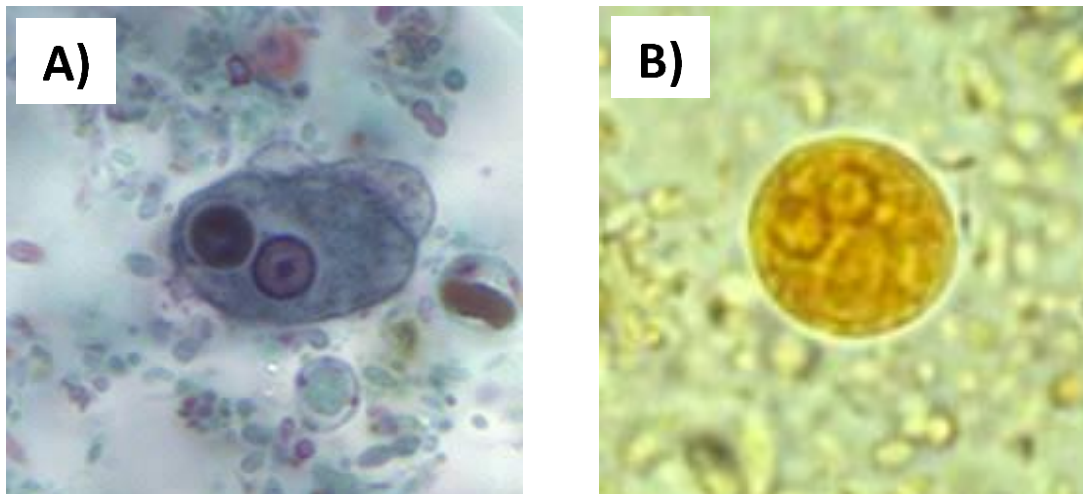
#### **4. Morfología**

Como se mencionó anteriormente, se distinguen dos estadios bien establecidos en el ciclo biológico de *E. histolytica*, éstos son: el trofozoíto y el quiste, ambos presentan características morfológicas particulares que permiten su identificación (Fig. 2).

El trofozoíto (Fig. 2 A) la forma móvil del parásito, es pleomórfico, mide entre 20 a 40  $\mu\text{m}$  de diámetro. Tanto su aspecto como su movilidad se ven influidos por los cambios de pH, potencial de óxido-reducción y osmolaridad entre otras condiciones del microambiente. Posee abundantes vacuolas en su citoplasma algunas de éstas contienen bacterias y eritrocitos fagocitados. Un aspecto interesante del trofozoíto es la carencia de los clásicos organelos visibles como son peroxisomas, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi (Lohia, 2003). Los ribosomas están arreglados en hélices en el citoplasma (Lohia, 2003). Pueden poseer más de un núcleo (Das & Lohia, 2002) como consecuencia de la formación de múltiples centros organizadores de microtúbulos y husos multipolares (Mukherjee *et al.*, 2009).

El quiste (Fig. 2 B) presenta una forma redonda u oval, existen en gran variedad de tamaños pero en general son de 10 a 16  $\mu\text{m}$  de diámetro, tienen menor contenido citoplásmico comparándolo con los trofozoítos. Poseen una cubierta gruesa que al microscopio de luz se observa como un halo. El quiste maduro está recubierto con una pared de quitina, que lo hace altamente resistente a los cambios de temperatura, humedad y presión osmótica (Reed, 1992). Dependiendo de su estado de madurez, los quistes pueden presentar de 1 a 4 núcleos, los cuales están delimitados por una membrana nuclear delgada, poseen condensaciones de cromatina agregada sobre la superficie interna, un nucléolo ubicado en la parte

central y presentan cuerpos cromáticos, que se observan como estructuras cilíndricas con punta roma (Barker, 1983; Lohia, 2003).



**Figura 2. *Entamoeba histolytica* en sus estadios morfológicos característicos.** A) Trofozoíto de *E. histolytica* con tinción tricromica. Se observa un eritrocito en su interior que aparece como una inclusión oscura. Presenta un solo núcleo de aspecto pequeño, situado al centro y con cromatina delgada y uniforme. B) Quiste inmaduro en preparación con lugol, se observan dos núcleos y una vacuola de glucógeno (CDC, 2015a; UNAM, 2015).

## 5. Mecanismos de Patogénesis

La patogénesis describe el origen y la evolución de una enfermedad con todos los factores involucrados en ella. La patogénesis de *E. histolytica*, la cual se evidencia en el daño a los tejidos, es un fenómeno multifactorial que incluye los mecanismos de adhesión, citotoxicidad y fagocitosis (Garcia-Rivera *et al.*, 1982; Martinez-Palomo *et al.*, 1985; Ravdin, 1986). Cada uno de estos mecanismos incluye la participación de diversas moléculas.

### 5.1 Adhesión

La adherencia de los trofozoítos a las células es un paso fundamental para que la destrucción celular ocurra (Orozco-Orozco *et al.*, 1980; Ravdin *et al.*, 1980). La importancia de la adherencia de las amibas se definió por la selección de clones deficientes en la adhesión a partir de una cepa virulenta (Garcia-Rivera *et al.*, 1982),

las clonas resultantes poseían bajo efecto citopático sobre cultivo de monocapas, fagocitosis y virulencia *in vivo* (Rodríguez & Orozco, 1986).

Con la inhibición de la adhesión del trofozoíto a su célula blanco, se ha demostrado que también se evita el evento patogénico sobre esta, sugiriendo que el contacto inicial es mediado por interacciones específicas y que la adhesión es necesaria para que ocurra la fagocitosis y la citólisis (Arroyo & Orozco, 1987; Cano-Mancera & Lopez-Revilla, 1987; Hughes *et al.*, 2003). Las principales moléculas que participan en los eventos de adhesión son del tipo adhesina y lectina. Las lectinas son proteínas que reconocen y se unen específicamente a glicanos sin causar una modificación, por otro lado las adhesinas son proteínas presentes en la superficie de bacterias, virus o parásitos que se unen a un ligando presente en la superficie de la célula blanco.

En la amiba se han descrito dos proteínas con actividad de lectina. La primera de éstas es inhibida por oligómeros de N-acetil-glucosamina (Kobiler & Mirelman, 1980), tiene un peso molecular de 220 kDa (Rosales-Encina *et al.*, 1987), además se ha demostrado su localización en la superficie de trofozoítos (Meza *et al.*, 1987). La segunda proteína con actividad de lectina es inhibida con N-acetil-galactosamina (GalNac) o galactosa (Gal), además se ha observado que al inhibirla, también se bloquea la citólisis de las células blanco (Ravdin & Guerrant, 1981). Esta segunda lectina conocida como Gal/GalNac se ha localizado en la membrana plasmática de trofozoítos (Ravdin *et al.*, 1986), posee un peso molecular de 260 kDa y se compone de dos subunidades con un peso de 170 kDa y 35 kDa (Petri *et al.*, 1989).

Se ha descrito en la amiba una adhesina de 75 kDa que participa en la adhesión entre el trofozoíto y su célula blanco (Arroyo & Orozco, 1987; Rodríguez *et al.*, 1989), esta molécula es parte del complejo EhCPADH, el cual se identificó con una migración de aproximadamente 124 kDa y se compone de dos proteínas, la primera de 75 kDa es la proteína que propiamente posee un dominio involucrado en la adherencia del trofozoíto a su célula blanco, recibe el nombre de EhADH, por otro lado, la segunda proteína de 49 kDa, es una cisteína proteasa y recibe el nombre de EhCP112 (García-Rivera *et al.*, 1999). Se ha logrado localizar a la proteína EhADH en vacuolas y en la membrana plasmática de trofozoítos (García-Rivera *et*

*al.*, 1997a), además durante el contacto con el eritrocito la proteína se localiza principalmente en sitios de contacto focal entre el trofozoíto y el eritrocito (García-Rivera *et al.*, 1997b).

## **5.2 Citotoxicidad**

La patogenicidad de la ameba se atribuye generalmente a la capacidad del parásito de destruir tejido a través de la adherencia, la muerte de la célula del huésped (citotoxicidad) y la proteólisis de la matriz extracelular (Horstmann *et al.*, 1992). El proceso de citotoxicidad lleva a la destrucción del tejido adyacente al trofozoíto, este fenómeno es conocido como histólisis y debido al mismo *E. histolytica* recibe su nombre.

Se ha observado el efecto citopático seguido del contacto directo de trofozoítos sobre monocapas celulares de las líneas CHO (del inglés “Chinesse Hamster Ovary”) (Ravdin *et al.*, 1980) y MCDK (del inglés “Madin-Darby Canine Kidney”) (Martínez-Palomo *et al.*, 1985). En esta última línea celular se demostró además, apertura de las uniones estrechas, distorsión de las microvellosidades, deformación de la superficie celular, formación de discontinuidades focales de la membrana y lisis.

El primer grupo de proteínas descrito implicado en la citotoxicidad, fue el de las proteínas formadoras de poros, conocidas como amebaporos. *E. histolytica* posee tres amebaporo conocidos como A, B y C (Leippe, 1999). Se ha descrito que estas moléculas presentan actividad sobre la membrana plasmática de macrófagos y linfocitos (Young *et al.*, 1982). Además, se ha observado que la inhibición de la síntesis del amebaporo A, genera una disminución significativa de la virulencia *in vitro* como *in vivo* (Bracha *et al.*, 1999).

*E. histolytica* posee alrededor de 50 cistein proteasas, estas enzimas actúan en gran variedad de sustratos del hospedero incluyendo mucina, laminina, colágeno y proteoglicanos (Ralston & Petri, 2011). Se ha identificado que cepas mutantes con baja virulencia carecen de la expresión de la EhCP1 (Keene *et al.*, 1990). La EhCP5 puede asociarse a la membrana plasmática y producir efecto citopático sobre células CHO (Jacobs *et al.*, 1998).

La proteína EhCP112 forma parte del complejo EhCPADH, es una cisteína proteasa de superficie que actúa sobre los componentes de la matriz extracelular como son colágena tipo 1 y fibronectina. Ensayos *in vitro* han revelado la capacidad de EhCP112 de destruir las monocapas en cultivo de células MCDK (Ocadiz *et al.*, 2005). Se ha observado la interacción de EhCP112 con componentes de las uniones estrechas como claudina-1 y ocludina, además, que al tratar extractos de trofozoítos con una mezcla de inhibidores de proteasas o anticuerpos dirigidos contra el complejo EhCPADH se bloquea la degradación de las proteínas de la unión estrecha: ocludina, claudina-1, ZO-1, ZO-2. Esto sugiere que el daño a nivel epitelial causado por *E. histolytica* es iniciado por la interacción del complejo EhCPADH con proteínas de las uniones estrechas, el cual lleva a la degradación de la mismas (Betanzos *et al.*, 2013). Adicionalmente, se ha mostrado que el silenciamiento de EhCP112 en una cepa virulenta, produce reducciones significativas en la citólisis y fagocitosis de la célula blanco, indicando la importancia de esta molécula en esos eventos (Ocadiz-Ruiz *et al.*, 2013).

### **5.3 Fagocitosis**

La fagocitosis se define clásicamente como el mecanismo para la internalización y destrucción de partículas de un tamaño mayor a 0.5  $\mu\text{m}$  (Groves *et al.*, 2008). Este proceso involucra la reorganización del citoesqueleto para formar una copa fagocítica que se cierra alrededor del ligando formando un fagosoma; posteriormente, se lleva a cabo el tráfico del fagosoma a lo largo de la vía endocítica y la fusión del fagosoma con el lisosoma para la digestión de las partículas internalizadas (Smith & Guillen, 2010).

En el intestino grueso *E. histolytica* es capaz de internalizar microorganismos (Bracha *et al.*, 1982), así como células del hospedero incluyendo células inmunes (Guerrant *et al.*, 1981) y no inmunes (Tsutsumi *et al.*, 1992), durante la invasión de los tejidos. La fagocitosis tiene un papel esencial en el crecimiento y constituye uno de los determinantes de virulencia claves para la amiba. Se ha demostrado que amibas deficientes en fagocitosis reducen la generación de absceso hepático amibiano en el modelo de hámster (Orozco *et al.*, 1983), la adhesión a eritrocitos, el efecto citopático y el efecto citotóxico (Rodríguez & Orozco, 1986).

Tanto en la fagocitosis como en la lisis de la célula blanco se requiere de la participación de microfilamentos. Ensayos utilizando inhibidores de la polimerización de elementos del citoesqueleto mostraron, la importancia de la polimerización de la miosina para la acidificación del fagosoma, no así de los microtúbulos ni de actina (Mitra *et al.*, 2005). Se ha comprobado también que la miosina IB participa en la remodelación del citoesqueleto en el evento de la fagocitosis de eritrocitos, esto debido a que esta molécula es reclutada en la copa fagocítica y posteriormente, durante la internalización, ésta se encuentra rodeando al fagosoma (Voigt *et al.*, 1999).

Análisis proteómicos han revelado que en el fagosoma de *E. histolytica* se encuentran un grupo muy diverso de moléculas; éstas pueden ser clasificadas en diversos grupos con respecto a los mecanismos biológicos en los que participan. 1) Transducción de señales: PI3K, PI5K, Ser/Thr cinasas, Adenilato cinasa, Rac1, Rho1, Rho GAP/GEF, RacA, C, D, G; 2) Citoesqueleto: Actina, Profilina, Talina, Miosina II,  $\alpha$ -actinina; 3) Tráfico vesicular: Rab1, Rab5, Rab7 A-E, Rab8, Rab11 B-C, Ras GEF/GAP, Adaptina, COPI- $\alpha$ , Clatrina, VPS15, VPS34; 4) Enzimas hidrolíticas: Fosfatasa ácida,  $\alpha$ ,  $\beta$ -amilasa, CP1, 2, 3, 4, 5, 6, Dipeptidil aminopeptidasa, Fosfolipasa A2, Serina proteasas, Amebaporo B; 5) Proteínas de superficie: Lectina Gal/GalNac y ATPasa transportadora de calcio (Okada *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 2006).

## **6. Trafico vesicular en *E. histolytica***

En *E. histolytica* aún no se han establecido claramente los compartimentos celulares involucrados en el tráfico vesicular. En la ameba el tráfico de proteínas a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi es un fenómeno muy importante relacionado con la patogénesis debido a la enorme cantidad de factores secretados por este parásito para lograr la muerte celular, invasión a tejido y el establecimiento de la inflamación en humanos. (Smith & Guillen, 2010).

El conjunto de membranas en el citoplasma de una célula eucarionte que divide a la misma en compartimentos estructurales y funcionales u organelos, se define como sistema endomembranoso, este se encuentra compuesto por membrana nuclear, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas y endosomas (Field &



Dacks, 2009). A pesar de que en los trofozoítos de *E. histolytica* no se observan organelos visibles clásicos como peroxisomas, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi, las amibas conservan funciones asociadas a ellos (Smith & Guillen, 2010). Análisis ultraestructurales en trofozoítos de *E. histolytica* han revelado la presencia de estructuras similares al retículo endoplásmico liso y el aparato de Golgi (Chavez-Mungía *et al.*, 2000). De la misma forma con la utilización de anticuerpos dirigidos a marcadores de retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi, se identificaron estructuras con similitud a estos organelos en *E. histolytica* (Ghosh *et al.*, 1999).

El tráfico vesicular se encuentra implicado en muchos aspectos de la virulencia de la amiba. Para el movimiento característico de los trofozoítos, es necesario el movimiento interno de vesículas hacia la membrana plasmática, esto para proporcionar una fuente de membrana, de la misma manera proporcionando moléculas que participan en la adhesión celular (Bretscher & Aguado-Velasco, 1998; Welter & Temesvari, 2004). Así mismo, el tráfico vesicular también tiene una implicación importante en el proceso de fagocitosis, el cual está estrechamente vinculado con la virulencia de la amiba (Orozco *et al.*, 1985). De igual manera la secreción de cisteína proteasas en lisosomas o fagosomas está relacionada con el evento de tráfico vesicular (Okada *et al.*, 2006). El tráfico membrana es esencial para la maduración controlada de fagosomas, en este proceso se encuentran implicadas las proteínas de tipo Rab, estas son GTPasas pequeñas que actúan en forma de interruptores para regular la fusión de las vesículas con las membranas blanco, a través de cambios conformacionales entre la forma activa (unida a GTP) e inactiva (unida a GDP) (Takai *et al.*, 2001). La maduración del fagosoma está acompañada por la fusión secuencial de los compartimentos endocíticos y biosintéticos, para formar finalmente el fagolisosoma (Stuart & Ezekowitz, 2005). En el genoma de *E. histolytica* se han identificado 91 proteínas Rab putativas, de las cuales 22 son homologas a Rab 1, Rab2, Rab5, Rab7, Rab8, Rab11 y Rab21 (Juarez *et al.*, 2001; Loftus *et al.*, 2005; Saito-Nakano *et al.*, 2004). Se han descrito nueve isotipos de Rab7 en la amiba, estas se han identificado en fracciones endosomales y fagosomas aislados por lo que podrían poseer funciones

importantes durante el tráfico vesicular del parásito (Okada *et al.*, 2005; Saito-Nakano *et al.*, 2004). Por otro lado, EhRab5 junto con EhRab7 están involucradas en la fase inicial de la biogénesis de vacuolas prefagosomales, y son esenciales para la fagocitosis eficiente de la ameba (Saito-Nakano *et al.*, 2004).

### **7. Cuerpos multivesiculares y la maquinaria ESCRT**

Los cuerpos multivesiculares o MVB (del inglés “multivesicular body”) son organelos de gran importancia presentes en células eucariotas, involucrados en el proceso de endocitosis mediada por ubiquitinación. Estas estructuras también se han relacionado con adquisición celular de nutrientes, regulación de receptores de membrana, presentación de antígenos y la gemación de algunos virus (Katzmann *et al.*, 2002; Williams & Urbe, 2007). El tamaño de los cuerpos multivesiculares generalmente está entre 400-500 nm (Gruenberg & Stenmark, 2004) y contienen vesículas intraluminales uniformemente redondas con un tamaño menor a 50 nm de diámetro (Williams & Urbe, 2007). Las vesículas intraluminales son generadas por la invaginación de brotes de la membrana hacia la parte interior de la vesícula. Este proceso, por medio del cual se lleva a cabo la formación de los cuerpos multivesiculares, es modulado por un grupo de proteínas que componen lo que colectivamente se conoce como complejo endosomal requerido para el transporte o ESCRT (del inglés “endosomal sorting complex required for transport”).

Se ha dividido la totalidad del complejo ESCRT en cuatro complejos conocidos como ESCRT-0, I, II, III, de acuerdo a la cronología de su participación en la formación de MVBs. Estos complejos trabajan en la cara citosólica de los cuerpos multivesiculares y están implicados en los procesos de reclutamiento de las proteínas cargo en vesículas intraluminales, invaginación de la membrana y el evento de escisión (Hurley, 2008). ESCRT-0, I y II contienen proteínas con dominios de unión a ubiquitina, la cual es una marca utilizada para la dirección de proteínas por esta vía, por lo que estos complejos funcionan en el reconocimiento y dirección de las proteínas ubiquitinadas. ESCRT-I y ESCRT-II cooperan para formar invaginaciones de la membrana endosomal (Wollert & Hurley, 2010). Las subunidades del complejo ESCRT-III se polimerizan formando estructuras con forma de espiral, estas se encargan de la constricción de la membrana para separar

la vesícula intraluminal en formación de la membrana del fagosoma (Avalos-Padilla *et al.*, 2015; Hurley & Hanson, 2010). ESCRT-III recluta a enzimas deubiquitinadas, que liberan la ubiquitina para evitar su degradación (Komander *et al.*, 2009). Finalmente la ATPasa Vps4 es reclutada para disociar los oligómeros de ESCRT-III a sus subunidades monoméricas y así poder ser utilizadas en eventos futuros (Komander *et al.*, 2009).

### **7.1 ESCRT-0 y Tom1**

En células de mamíferos el primer paso de la vía de formación de MVB es el reconocimiento y la concentración de la carga ubiquitinada en subdominios endosomales, esto es realizado por el complejo conocido como ESCRT-0. En *Saccharomyces cerevisiae* el complejo ESCRT-0 está compuesto por las moléculas Vps27 que tiene una proteína homóloga en el humano conocida como Hrs (del inglés “hepatocyte receptor tyrosine kinase substrate”) y la proteína Hse1 que en el humano es conocida como STAM (del inglés “signal transducing adaptor molecule”) 1/2 (Williams & Urbe, 2007).

Ambos componentes del complejo ESCRT-0, Hrs y STAM tienen dominios de unión a ubiquitina conocidos como UIM (del inglés “Ub Interaction Motifs”) (Bilodeau *et al.*, 2002). Se ha observado que el complejo ESCRT-0 se acumula principalmente en endosomas tempranos. Esta distribución es dirigida, al menos en parte por el dominio FYVE (por Fab1, YGL023, Vps27, y EEA1) presente en Hrs, que exhibe alta afinidad por fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) el cual está enriquecido en la membrana endosomal (Katzmann *et al.*, 2003; Stahelin *et al.*, 2002). De la misma manera en Hrs se ha localizado un dominio de interacción con clatrina, lo que proporciona un mecanismo de reclutamiento de esta molécula a endosomas tempranos (Raiborg *et al.*, 2001). Como ya se mencionó anteriormente el ESCRT-0 actúa como un adaptador clave para el reclutamiento de ESCRT-I. Específicamente debido al dominio PxxP dentro del carboxilo terminal de Hrs, éste se asocia con el dominio UEV (del inglés “Ubiquitin E2 Variant”) presente en Vps23, el cual es una subunidad del complejo ESCR-I (Katzmann *et al.*, 2003).

En organismos que carecen del complejo ESCRT-0, incluyendo a protistas y plantas es necesario un adaptador alternativo que regule la orientación de ESCRT-I al

endosoma. El mejor candidato para esto lo forman las proteínas de la familia Tom1, estas proteínas albergan dominios de unión a ubiquitina conocidos como GAT, de asociación a clatrina, de asociación a Vps23 y de unión a fosfolípidos de membrana (Blanc *et al.*, 2009; Herman *et al.*, 2011; Yamakami *et al.*, 2003).

## **7.2 ESCRT-I**

El complejo ESCRT-I es definido como un complejo proteico de 350 kD que está constituido por proteínas vesiculares de clase E o Vps (del inglés “Vacuolar protein sorting”) conocidas como Vps23, 28 y 37, además de la proteína conocida como Mvb12 o UBAP1 (Katzmann *et al.*, 2001). Se reconoce que estas cuatro subunidades se co-ensamblan en una relación estequiométrica 1:1:1:1, para formar un heterotetrámero (Agromayor *et al.*, 2012; Kostelansky *et al.*, 2007).

ESCRT-I es requerido para la dirección de las proteínas ubiquitinadas hacia MVBs, para lo cual es necesaria una interacción con la marca de las proteínas, que es la ubiquitina. Esta interacción ocurre gracias a Vps23, específicamente al dominio UEV el cual se une a ubiquitina (Pornillos *et al.*, 2002). Es importante mencionar que la región de reconocimiento en la ubiquitina es distinta a la que reconoce el dominio UIM en Hrs (Bilodeau *et al.*, 2003). Se ha encontrado que UBAP1 humana y Mvb12 de *S. cerevisiae* poseen dominios de unión a ubiquitina conocidos como UBA (del inglés “ubiquitin associated”), los cuales les permiten a estas moléculas unirse a las proteínas cargo (Agromayor *et al.*, 2012; Shields *et al.*, 2009). Análisis *in vitro* han mostrado que la Mvb12 es capaz de unirse a liposomas que contienen fosfatidilserina, lo que podría proveer la capacidad del ESCRT-I de ser reclutado hacia endosomas tempranos (Boura & Hurley, 2012).

## **7.3 ESCRT-II, ESCRT-III y proteínas accesorias de la maquinaria ESCRT**

ESCRT-II es un heterotetrámero que consiste en una subunidad de Vps22 (EAP30) y Vps36 (EAP45), y dos subunidades de Vps25 (Babst *et al.*, 2002b). En *S. cerevisiae* ESCRT-II interactúa con ESCRT-I a través del dominio GLUE (del inglés “GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45”) de Vps36 y el carboxilo terminal de Vps28 (Gill *et al.*, 2007). Dos dominios NZF (del inglés “Npl4-type zinc finger”) están dentro del dominio GLUE, uno de éstos une a ESCRT-I y el segundo interacciona con la

ubiquitina (Teo *et al.*, 2006). ESCRT-II es capaz de interactuar con alta afinidad con fosfatidilinositol 3P a través del dominio GLUE (Slagsvold *et al.*, 2005).

ESCRT-III consiste en cuatro subunidades: Vps20, Snf7, Vps24 y Vps2 (Babst *et al.*, 2002a). En mamíferos éstas son denotadas como CHMP (del inglés “charged multivesicular body proteins”) 6, 4, 3 y 2 respectivamente. Los monómeros de ESCRT-III no localizan en el endosoma, sino que existen en un estado autoinhibido en el citoplasma. La activación de ESCRT-III ocurre cuando la subunidad de ESCRT-II Vps25 se une a Vps20, iniciando el reclutamiento de ESCRT-III al endosoma. Vps20 recluta a Snf7, el cual al polimerizar recluta a Vps24. Snf7 recluta también a la proteína Bro1/Alix (del inglés “BCK1-like resistance to osmotic shock protein-1/apoptosis-linked gene-2 interacting protein X”) que estabiliza los filamentos de Snf-7 y recluta a la enzima deubiquitinasa Doa4 (Luhtala & Odorizzi, 2004). Finalmente Vps2 es reclutado al endosoma gracias a Vps24 (Teis *et al.*, 2008).

Una vez ensamblado el complejo ESCRT-III, se requiere energía para disociar los complejos de la membrana endosomal. La energía es suministrada por la ATPasa Vps4, esta se une a subunidades de ESCRT-III a través del dominio MIT (del inglés “microtubule-interacting and trafficking”) localizado en el amino terminal, éste reconoce a MIM (del inglés “MIT-interacting motif”) localizado en el carboxilo terminal de subunidades de ESCRT-III (Babst *et al.*, 1997; Babst *et al.*, 1998).

## II. Antecedentes

Los primeros estudios de la maquinaria ESCRT y la formación de MVB se realizaron en *S. cerevisiae*, y se han enfocado en la caracterización de las moléculas implicadas en cada uno de los complejos ESCR-0, I, II y III; además del análisis de los dominios estructurales así como los funcionales y la importancia de la formación de los MVBs en diferentes eventos celulares (Babst *et al.*, 2002a; Babst *et al.*, 2002b; Katzmann *et al.*, 2001; Kostelansky *et al.*, 2007). La mayoría de estos hallazgos se han logrado traslapar al humano, pero se han encontrado diferencias en los componentes del sistema en ambos organismos así como en los procesos en donde participan (Henne *et al.*, 2011).

Un estudio filogenético (Leung *et al.*, 2008) realizado con la finalidad de identificar ortólogos de los componentes del sistema ESCRT en los diferentes grupos que componen a los organismos eucariotas, encontró que en los taxones analizados (*Opisthokonta*, *Amoebozoa*, *Archaeplastida*, *Chromalveolata* y *Excavata*) está presente al menos una proteína perteneciente a los complejos ESCRT-I, II, III y asociados al complejo ESCRT-III. Además, se observó que por lo menos una proteína del complejo ESCRT-III y una proteína accesoria estaban presentes en todos los genomas de los organismos analizados, lo que plantea la importancia de este grupo de proteínas en la formación de los MVBs. Por otro lado el complejo ESCRT-0 se encontró exclusivamente en el clado *Opisthokonta*, lo que hace suponer que este complejo es de carácter dispensable en la formación de los MVBs. Esta idea es apoyada por resultados que muestran que el silenciamiento de Vps27 (miembro del complejo ESCR-0) no tiene efectos significativos sobre la endocitosis del receptor del factor de crecimiento epidermal (Raiborg *et al.*, 2008), además, de la formación de MVBs en organismos no pertenecientes a este clado (Blanc *et al.*, 2009; Herman *et al.*, 2011).

Estudios de microscopía electrónica de trofozoítos de *E. histolytica* (Okada & Nozaki, 2006; Saito-Nakano *et al.*, 2004) han identificado la formación de estructuras características de MVBs de diferentes tamaños. Además Saito-Nakano y colaboradores lograron evidenciar la presencia de CP2 y amebaporo A en MVBs. La posible participación de la maquinaria ESCRT en *Entamoeba histolytica* fue resuelta gracias a análisis proteómicos (Okada *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 2006) de

fagosomas de *Entamoeba histolytica*; éstos revelaron la presencia de ubiquitina, ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa (deubiquitinasa) y una proteína homóloga a SNF7 (miembro del complejo ESCRT-III), lo que sugiere fuertemente un mecanismo similar a la maquinaria ESCRT en *E. histolytica*.

Análisis bioinformáticos realizados en el 2008 (Leung *et al.*, 2008) mostraron que en el genoma de *E. histolytica* estaban codificadas por lo menos 11 proteínas pertenecientes a los complejos ESCRT-I, II, III y asociado al III. Pero fue posteriormente (Lopez-Reyes *et al.*, 2010) que además de detectarse los genes homólogos a proteínas del complejo ESCRT en *E. histolytica*, se mostró experimentalmente que al menos 15 de ellos se transcriben y 5 de ellos aumentan su transcripción durante la fagocitosis.

Un análisis bioinformático (Banuelos *et al.*, 2005) realizado sobre la proteína EhADH concluyo que ésta, presenta un dominio Bro1, lo cual la relaciona con la familia de proteínas ALIX en mamíferos (Bro1 en levaduras), proteínas que participan en la formación de MVBs. Asimismo, se encontró (Banuelos *et al.*, 2012) que al igual que las proteínas en humano y levadura, EhADH puede interacciona con elementos del complejo ESCRT-III, en este caso con una proteína EhVps32. Además, EhADH al participar como una proteína accesoria del ESCRT-III se localiza en la superficie celular y en compartimentos endosomales, por lo que posiblemente contribuye a la formación de MVBs en *E. histolytica*. Asimismo, López-Reyes y colaboradores en el 2010 caracterizaron a la proteína Vps4 (asociada al complejo ESCRT-III), la cual presenta actividad de ATPasa. Se localizó a esta molécula dentro de fagosomas rodeando a eritrocitos, y se mostró que mutaciones en el sitio catalítico de EhVps4 repercuten significativamente en los niveles de eritrofagocitosis, en el efecto citopático y en la producción de los trofozoítos de abscesos hepáticos, debido a lo cual ésta molécula se relacionó con la patogénesis de la amiba.

En nuestro grupo de trabajo se ha probado (Avalos-Padilla *et al.*, 2015) que EhVps32 se encuentra presente durante el evento de eritrofagocitosis en fagosomas, además colocaliza en copas fagocítica con lectina Gal/GalNac y actina. Ensayos *in vitro* e *in vivo* mostraron que la proteína EhVps32 recombinante puede oligomerizarse, adquiriendo forma de anillos y filamentos, además, se observó la

oligomerización de esta proteína durante la eritrofagocitosis. Adicionalmente, ensayos de silenciamiento probaron la importancia de la molécula durante eventos de fagocitosis y pinocitosis. Recientemente se ha logrado identificar los otros elementos que componen al complejo ESCRT-III en *E. histolytica*, estos elementos EhVps2, EhVps20, EhVps24 se ha observado su asociación a vesículas fagocíticas en el evento de eritrofagocitosis. Adicionalmente, se ha encontrado que la adición secuencial de EhVps20 (1-173), EhVps32, EhVps24 y EhVps2 llevan a la formación de vesículas intraluminales en el modelo de vesículas gigantes unilamelares (Tesis de Doctorado Avalos-Padilla 2016).

Análisis bioinformáticos se han realizado para detectar las proteínas codificadas en el genoma de *E. histolytica*, sin embargo los resultados concernientes al complejo ESCRT-0 son contradictorios (Leung *et al.*, 2008; Lopez-Reyes *et al.*, 2010). Debido a la falta del complejo ESCRT-0 en la mayoría de eucariontes se ha propuesto que deben existir moléculas que suplan la actividad de este complejo. Una familia de proteínas propuesta para esta actividad es el de las proteínas Tom1. En *Dictyoselium discoideum* (Blanc *et al.*, 2009) se ha comprobado que una proteína pertenecientes a ésta familia tiene capacidad de unirse a ubiquitina por medio al dominio GAT, interactuar con clatrina y Vps23 gracias a dominios presentes en su extremo carboxilo. Además, se observó la capacidad de los dominios VHS y GAT de interactuar con fosfolípidos, lo que podría proveer a la molécula de anclaje a la membrana endosomal. En *E. histolytica* mediante un análisis bioinformático (Herman *et al.*, 2011) se ha mostrado que en su genoma están codificadas al menos dos proteínas pertenecientes a la familia Tom1.



### III. Justificación

*E. histolytica* es un parásito responsable de al menos 100,000 muertes al año a nivel mundial. Su potencial patógeno está relacionado a mecanismos celulares: adherencia, citotoxicidad y fagocitosis. El tráfico vesicular tiene un papel fundamental en la biología del parásito, participando en procesos de nutrición, movimiento, patogénesis (invasión y fagocitosis). Esto mediante la modelación de membranas internas y externas, procesos muy dinámicos en el cual participan gran cantidad de proteínas.

Recientemente se ha estudiado el complejo ESCRT en diferentes modelos eucariotas donde se ha encontrado la gran importancia de esta maquinaria en procesos como: la regulación de receptores, abscisión de las membranas durante la citocinesis y la gemación de algunos virus. Por otra parte, en *E. histolytica* se ha evidenciado la formación de MVBs, así como la presencia de componentes del complejo ESCRT-III (Vps2, Vps20, Vps24 y Vps32) y de proteínas asociadas al complejo ESCRT-III (Vps4 y EhADH112). Se ha mostrado la contribución de estas moléculas en el evento de eritrofagocitosis y tráfico vesicular. Sin embargo, se desconoce la contribución de miembros de los complejos ESCRT-0, -I y -II. Complejos que están directamente involucrados en el inicio de la endocitosis en otros organismos.

Dado que diversos análisis bioinformáticos predicen la existencia del elemento Vps23 (ESCRT-I) y que además los niveles de su mensajero responden diferencialmente durante el evento de la eritrofagocitosis, proponemos el estudio de la dinámica de esta molécula durante el evento de eritrofagocitosis de los trofozoítos. De igual manera, trabajos recientes proponen que organismos carentes de elementos del ESCRT-0, proteínas pertenecientes a la familia Tom1 podrían estar llevando a cabo algunas de sus funciones, interesantemente se han identificado genes que codifican estas proteínas en el genoma de *E. histolytica*.

Por lo tanto, la identificación de las proteínas EhTom1 y EhVps23, así como el estudio de su participación en la eritrofagocitosis, ayudará a entender la importancia de estos complejos en este evento así como en la endocitosis.

#### **IV. Hipótesis**

*E. histolytica* expresa las proteínas EhTom1 y EhVps23, las cuales participan en el fenómeno de eritrofagocitosis.

#### **V. Objetivos**

- **Objetivo General**

- Identificar a las proteínas EhTom1 y EhVps23 en trofozoítos de *E. histolytica* y estudiar su participación durante los eventos de eritrofagocitosis.

- **Objetivos Particulares**

- Identificar y caracterizar mediante análisis *in silico* las proteínas EhTom1 y EhVps23 en *E. histolytica*.
- Identificar a las proteínas EhTom1 y EhVps23 nativas.
- Determinar los niveles de mensajero en trofozoítos de *E. histolytica* y los cambios de estos durante la eritrofagocitosis.
- Estudiar la localización de EhTom1 y EhVps23 en trofozoítos de *E. histolytica* en condiciones basales y durante la eritrofagocitosis.

## VI. Diseño experimental

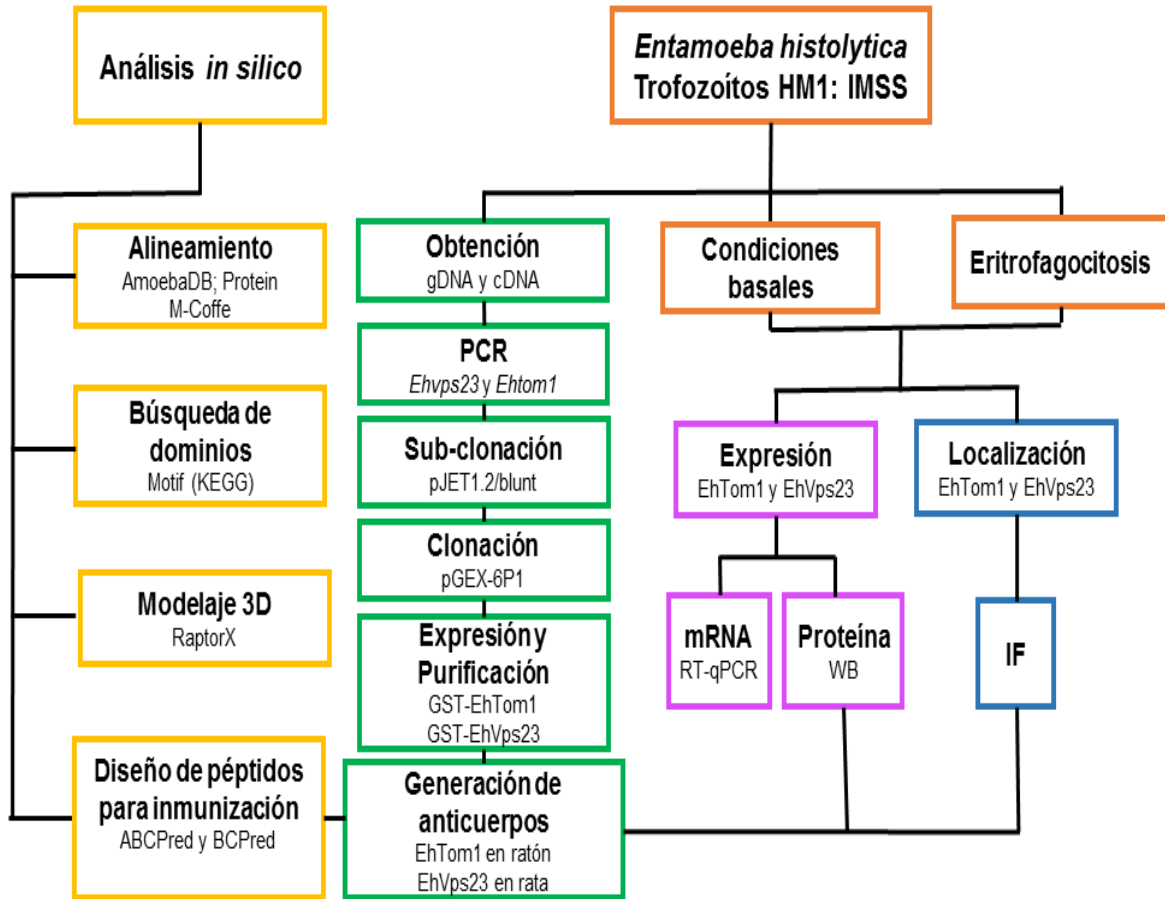


Figura 3. Diseño experimental

## VII. Material y Métodos

### 7.1 Análisis *in silico*

En el análisis *in silico* se realizó la búsqueda de homólogos de las moléculas Vps23 y Tom1 en la base de datos del genoma de *E. histolytica* AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba>). Primero se buscaron las secuencias de las proteínas Vps23 y Tom1 reportadas en el humano y *Saccharomyces cerevisiae*, para esto se utilizaron las bases de datos Protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) y Keeg (<http://www.genome.jp/kegg>). Con la secuencia obtenida se procedió a realizar una búsqueda de proteínas homólogas codificadas en el genoma de la amiba en la base de datos AmoebaDB con la herramienta BLAST usando una matriz Blosum62. Posteriormente se realizaron alineamientos secuenciales de las proteínas identificadas con sus homólogas de humano y levadura, para lo cual se utilizo el programa M-Coffe (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:mcoffee>), a las proteínas seleccionadas como posibles homólogos se les predijo los dominios funcionales y estructurales con la herramienta SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) y Motif proporcionado por Kegg.

Las secuencias primarias de las posibles proteínas homólogas a Vps23 y Tom1 se mandaron al servidor JPred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred>) para predecir la estructura secundaria y a RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) para generar el modelaje tridimensional de las proteínas, además se realizó una comparación con las estructuras reportadas de los dominios característicos en la base de datos PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). De igual manera se realizó un alineamiento estructuras con los modelos tridimensionales de sus homologas en humano y levadura.

### 7.2 Cultivo de Trofozoítos de *E. histolytica*

Los trofozoítos de la clona A cepa HM1: IMSS (Orozco *et al.*, 1982) fueron cultivados axénicamente a 37 °C en medio TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1987), suplementado con 10% con suero bovino (ECHITEC-BIO; GIBCO, Invitrogen), 6% de la mezcla de vitaminas de Diamond (JRH, Biosciences), 1.2 U/ml de Penicilina (Lakside) y 1.4 mg/ml de estreptomycin (Lakside).

Una vez que alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento, los trofozoítos se despegaron mediante una incubación en hielo durante 10 minutos, los trofozoítos se cosecharon a 500 g durante 10 minutos a 4°C, se realizaron 2 lavados con PBS a 4 °C para eliminar los remanentes de medio. Para cuantificar el número de amibas, se realizó un conteo en cámara de Neubauer empleando la siguiente formula:

$$Amibas/ml = \frac{Amibas \text{ (sumatoria de los cuatro cuadrantes)}}{4} \times Factor \text{ de dilución}$$

### **7.3 Obtención de DNA genómico en *E. histolytica***

La obtención de DNA genómico se realizó utilizando el kit “Wizard<sup>R</sup> SV Genomic DNA Purification System” (Promega). Un cultivo de  $6 \times 10^6$  en fase logarítmica se cosechó como se mencionó anteriormente. El paquete celular se resuspendió en 1.5 ml de PBS frío y se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 ml. Nuevamente se centrifugó a 13,000 g durante 10 segundos y se eliminó el sobrenadante; la pastilla resultante se resuspendió en 600 µl de solución de lisis de núcleos y se mezcló suavemente; inmediatamente después se añadió 3 µl de la solución de RNAsa, se mezcló fuertemente el tubo y se incubó durante 30 min a 37 °C. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se añadieron 200 µl de solución de precipitación de proteínas, se agitó en vórtex y se enfrió en hielo durante 5 min. Después se centrifugó a 13,000 g durante 6 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se le agregó 600 µl de isopropanol y se mezcló suavemente por inversión. Posterior a esto, se centrifugó a 13,000 g durante un min a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y a las pastillas se añadieron 600 µl de etanol al 70%, se mezcló suavemente para lavar el DNA obtenido y se centrifugó a 13,000 g durante 1 min a temperatura ambiente. El etanol se eliminó cuidadosamente y la pastilla se secó durante 15 min en la campana de flujo laminar. Para finalizar, la pastilla de ADN se rehidrató con 100 µl de agua libre de nucleasas, el DNA se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop) a 260/280 nm, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

#### **7.4 Obtención de cDNA en *E. histolytica***

En primer lugar se obtuvo de RNA total de trofozoítos de *E. histolytica* mediante la utilización de TRIzol®. Para esto se partieron de  $1 \times 10^6$  trofozoítos cosechados y lavados. Estos se centrifugaron a 13,000 g por 10 min, el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 200  $\mu$ l de TRIzol®, posterior a esto, la mezcla se centrifugó suavemente e incubó 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 30  $\mu$ l de cloroformo, se agitó vigorosamente incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 13,000 g por 15 min a 4°C, se tomó la fase superior y se pasó a un tubo Eppendorf nuevo, se agregaron 75  $\mu$ l de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló suavemente por inversión e incubó 10 min a temperatura ambiente, pasando este tiempo se centrifugo a 13,000 g durante 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se lava dos veces la pastilla con 500  $\mu$ l de etanol al 75% (en agua DEPC). Se retiró el etanol completamente en la campana de flujo laminar, la pastilla resultante se resuspendió en 30  $\mu$ l de Agua DEPC. El RNA se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop) a 260/280 nm, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Para el caso de qRT-PCR se utilizó inmediatamente después de la obtención.

Para la obtención de cDNA a partir de RNA total se utilizó el kit "First Strand cDNA Synthesis". Primero se hizo el tratamiento del RNA para eliminar el gDNA que pudiera estar presente, para lo cual en un tubo Eppendorf se agregaron 5  $\mu$ g de RNA total extraído, 1  $\mu$ l de buffer de reacción, 1  $\mu$ l de DNasa, Agua libre de nucleasas hasta un volumen de 10  $\mu$ l. Para llevar a cabo la reacción este tubo se incubó a 37°C durante 30 min, después de este tiempo se le agrego 1  $\mu$ l de EDTA 50mM y se incubó a 65°C durante 10 minutos para detener la reacción. Se tomó una alícuota de 1  $\mu$ l de la reacción para meterlo como control durante la PCR. Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción se colocó en un tubo Eppendorf 1  $\mu$ l de oligo dt, 5  $\mu$ g de RNA total tratado con DNasa, 1  $\mu$ l de dNTPs. La mezcla se incubo a 65°C durante 5 min, se enfrió en hielo y se le dio un spin. Posteriormente se agregó 4  $\mu$ l de buffer 5X first strand, 2  $\mu$ l de DTT 0.1M y 1  $\mu$ l de RNA sin; se mezcló suavemente el contenido e incubo a 42°C 2 min. Se agregó 1  $\mu$ l de Super Script II RT (200U), se mezcló por pipeteo e incubo a 42°C durante 50 min. La

reacción se inactivó por calor a 70°C durante 15 minutos. Para eliminar el RNA se agregó 1 µl de RNasa y se incubó a 37°C por 20 min. El cDNA se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop) a 260/280nm, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### **7.5 Diseño de oligonucleótidos específicos y PCR**

El diseño del par de oligonucleótidos específicos para los genes de Ehtom1 y Ehvps23 se realizó empleando la herramienta “PCR Oligo Marker” que se encuentra disponible en la red (<http://www.yorku.ca/pjohnson/AssemblyPCRoligomaker.html>).

Además, a estos oligonucleótidos se les agregaron secuencias reconocidas por las enzimas de restricción BamHI para el oligo en sentido y EcoRI para el oligo en antisentido. A los oligos diseñados se les realizó un análisis de BLAST en la base de datos de E. histolytica (AmoebaDB) con la finalidad de comprobar que las secuencias elegidas se localizaran exclusivamente en nuestros genes de interés.

Para probar la eficacia de la amplificación de la totalidad de los genes Ehtom1 y Ehvps23 (855 y 1485 pb, respectivamente) se procedió a realizar PCR punto final, se tomó como molde cDNA para el gen Ehtom1 debido a que este presentaba en la secuencia un intron; para el gen Eh Vps23 se utilizó de gDNA. Para la reacción de PCR se hizo la siguiente mezcla de reacción 100 ng del molde, 200 µM de cada uno de los oligonucleótidos correspondientes (sentido y antisentido), 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), buffer 1X, 2mM de cloruro de magnesio, 0.2 U de la enzima Taq polimerasa y se aforó con agua libre de nucleasas a un volumen final se 10 µl. Para los controles negativos, para el caso de la amplificación del gen Ehtom1 se usó la mezcla de reacción pero se colocó como molde un paso intermedio en la obtención del cDNA (RNA tratado con DNasa), para el caso de la amplificación del gen Ehvps23 se colocó toda la mezcla de reacción excepto gDNA. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf, utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 1 min, seguido por 35 ciclos (15 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 2 min a 72 °C) y finalmente un extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1%, en solución TAE (Tris-Acetato-EDTA).

Para la obtención del gen de interés para la clonación se realizó una reacción de PCR con el kit “KAPA Hifi Hot Start PCR”. La mezcla de reacción fue la siguiente 100 ng del molde, 300  $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos correspondientes (sentido y antisentido), 300  $\mu$ M de KAPA dNTPMix, KAPA Hifi Buffer 1X, 2mM de cloruro de magnesio, 1 U de la enzima KAPA Hifi Hot Start DNA polymerase y se aforo con agua libre de nucleasas a un volumen final de 50  $\mu$ l. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf, utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido por 35 ciclos (20 s a 98 °C, 15 s a 60 °C y 30 s a 72 °C) y finalmente un extensión final a 72°C por 1 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1%, en solución TAE (Tris-Acetato-EDTA). Las bandas del amplificado para cada caso se cortaron de los geles de agarosa y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

#### **7.6 Purificación de DNA a partir de agarosa**

Las bandas correspondientes con el fragmento de interés se purificaron con el kit “GeneJET Gel extraction” (Fermentas). Las bandas ya cortadas fueron pesadas dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Después, se agregó un volumen 1:1 del amortiguador de unión y se incubó la mezcla a 60°C durante 10 min o hasta que el gel estuviera completamente disuelto. La mezcla se agitó suavemente por inversión y se agregaron un volumen de isopropanol al 100% y se mezcló vigorosamente. La mezcla se cargó en la columna de purificación GeneJET y se centrifugó a 13,000 g durante 1 min y se descartó el líquido. Con la finalidad de lavar el DNA unido a la columna, se colocaron 100  $\mu$ l del amortiguador de unión, se centrifugó igual que en el paso anterior y se lavó con 700  $\mu$ l de amortiguador de lavado, nuevamente se centrifugó en las condiciones establecidas. Se descartó el contenido en el tubo colector y se volvió a centrifugar 1 min a 13,000 g para remover los residuos de etanol. Finalmente para eluir el DNA obtenido, la columna se montó en un tubo nuevo y se adicionó 50  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y se centrifugó. El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm (Nanodrop) y se almacenó a -20°C hasta su uso.



### **7.7 Ligación del producto de PCR purificado al plásmido pJET1.2/blunt y transformación**

Los genes Ehtom1 y Ehvps23 amplificados y purificados se ligaron al vector pJET1.2/blunt (Fermentas) el cual permite clonar directamente productos de PCR que posean extremos romos generados por la ADN polimerasa de alta fidelidad. Adicionalmente este vector posee un gen letal que es interrumpido por la ligación de un inserto en el sitio de clonación, de manera de que solo las células que poseen los plásmidos recombinantes son capaces de sobrevivir, eliminando la necesidad de seleccionar clonas. La reacción de ligación fue la siguiente 2 µl de Buffer de reacción 2X, 75 ng del producto de PCR purificado, 25 ng del vector de clonación pJET1.2/blunt, 1 µl de DNA ligasa T4 y se llevó a un volumen final de 20 µl con agua libre de nucleasas. Se le dio vórtex brevemente y se centrifugo 3 s, la mezcla de ligación se incubo a temperatura ambiente durante 5 min. La mezcla se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **7.8 Producción de *Escherichia coli* competentes**

A partir de una colonia de bacterias *Escherichia coli* DH5α se produjo un cultivo en 5 ml de medio Luria-Bertani (LB: 10 g de triptona; 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, 950 ml de agua desionizada) y se incubó a 37°C a 170 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se inocularon 400 µl de cultivo inicial en 40 ml de medio LB y se incubo a 37°C a 170 rpm hasta que las bacterias alcanzaron una densidad óptica de 0.4, a una longitud de onda de 600 nm. El cultivo se colectó en tubos cónicos de 50 ml y se centrifugo a 1700 g a 4°C durante 5 min, la pastilla se resuspendió en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frio y se incubo durante 20 min a 4°C. Terminando este tiempo la muestra se centrifugo nuevamente a 1700 g a 4°C durante 5 min, la pastilla se resuspendió en 4 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frio y se guardó a 4°C hasta su uso. Las células se mantienen estables hasta por 7 días.

La preparación de bacterias competentes *E. coli* BL21 fue similar al procedimiento descrito anteriormente, excepto que las colonias se cultivaron en medio LB adicionado con cloranfenicol a una concentración de 34 µg/ml.

### **7.9 Transformación de células competentes**

Para introducir los plásmidos deseados en las bacterias *E. coli*, se colocaron 100  $\mu$ l de células competentes frescas y se agregaron 20 ng del plásmido (o toda la reacción de ligación en caso de ser el caso), la mezcla se incubó durante 30 min a 4°C, posteriormente se dio un choque térmico durante 45 s a 42°C, seguido por una incubación de 5 min en hielo. Al término de este tiempo se adicionaron 300  $\mu$ l de medio LB y se incubó 1 hora a 37°C en agitación (200 rpm). Después de esta incubación, las células recién transformadas fueron espatuladas en cajas de Petri que contenían agar LB adicionado con ampicilina a una concentración de 100  $\mu$ g/ml para las células DH5 $\alpha$  o cloranfenicol 34  $\mu$ g/ml en caso de BL21. Finalmente las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C.

### **7.10 Selección de clones transformantes por PCR**

Para la selección de colonias transformantes con el gen de interés se procedió a realizar reacciones de PCR usando como molde 1  $\mu$ l de cultivo con una densidad óptica 0.4 a 600 nm de cada una de las colonias a analizar. La mezcla de reacción así como el programa utilizado fueron los mismos que se utilizaron anteriormente. Se usó como control negativo cultivo de bacterias DH5 $\alpha$  sin transformar. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1%, en solución TAE (Tris-Acetato-EDTA).

### **7.11 Congelación de bacterias**

Con la finalidad de conservar las bacterias transformadas se procedió a la congelación de las mismas. Una colonia de bacterias transformadas se cultivó en 5 ml de medio LB durante toda la noche, a 37°C a 170 rpm. Al día siguiente el contenido de cada tubo se empastilló en un tubo de 1.5 ml centrifugándose a 12,000 g durante 1 min. El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en un volumen de 500  $\mu$ l de glicerol diluido al 25% en medio LB. Posteriormente, la muestra se incubó a 4°C durante 10 min para que el glicerol pudiera penetrar bien a las células, las bacterias se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Para el caso de bacterias DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido pJET1.2/blunt recombinante se adicionó a la ampicilina a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml y

en el caso de las cepas BL21 se adicionó cloranfenicol a una concentración final de 34 µg/ml.

### **7.12 Purificación de plásmidos**

Para realizar la extracción de plásmidos se utilizó el kit “QUIAGEN Plasmid Purification” (QUIAGEN). Las colonias resultantes de cada transformación se crecieron en 5 ml de medio LB durante toda la noche, a 37°C con agitación constante (180 rpm). El medio fue suplementado con 100 µg/ml de ampicilina cuando se cultivaron bacterias *E.coli* DH5 $\alpha$ , o bien suplementado además con 34 µg/ml de cloranfenicol cuando se cultivaron bacterias de la cepa BL21. Los cultivos iniciales se diluyeron 1:500 en medio LB selectivo, se incubaron a 37°C por 12-16 horas en agitación constante (180 rpm). A continuación, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 6000 g, durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se descartó. La pastilla se resuspendió en 4 ml de amortiguador “P1”, posteriormente se le adiciono 4 ml de amortiguador “P2”, se mezcló por inversión 4 a 6 veces y se incubó a 4°C durante 15 min. La mezcla fue centrifugada a 20,000 g durante 30 min a 4°C, se colectó el sobrenadante y se filtró para eliminar detritus celulares no deseados. Al mismo tiempo, una columna QUIAGEN-tip100 se equilibró agregando 4 ml de amortiguador QBT y permitiendo que la columna se vaciara por fuerza de gravedad. Una vez equilibrada la columna, se agregó el sobrenadante filtrado y se permitió su entrada a la resina mediante fuerza de gravedad. La columna se lavó con dos volúmenes de 10 ml de amortiguador QC y el ADN plasmídico se eluyó con 5 ml del amortiguador QF precalentado a 65°C. El ADN obtenido se precipitó adicionando 3.5 ml de isopropanol, se mezcló y se centrifugo a 2,500 g durante 1.5 horas a 4°C. Al término de este tiempo, el sobrenadante se decantó cuidadosamente y la pastilla con el ADN se lavó con 2 ml de etanol al 70%, centrifugando a 2,500 g durante 10 min. La pastilla se dejó secar en campana de flujo laminar hasta que se evaporara completamente el etanol. Finalmente el ADN seco, se resuspendió en un volumen apropiado de agua libre de nucleasas y se guardó a -20°C hasta su uso.

### **7.13 Secuenciación**

Para confirmar la ausencia de mutaciones en la secuencia de los genes Ehtom1 y Ehvps23, así como asegurar que los genes se encontraran en marco de lectura adecuado, se realizó la secuenciación nucleotídica de manera automatizada. Para llevar a cabo la secuenciación se utilizó el kit “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing”, la mezcla de reacción fue la siguiente 4  $\mu$ l de BigDye v3.1, 80 ng del primer, 800 ng del DNA molde y se aforo con agua libre de nucleasas hasta 20  $\mu$ l. La condiciones de reacción utilizadas fueron las siguientes una desnaturalización a 96°C durante 5 min y 30 ciclos (96°C 30 s, Tm del oligonucleótido 30 s, 60°C 4 min). Se realizó la precipitación de la reacción de secuenciación de la siguiente manera, la totalidad de la mezcla de reacción se transfirió a un tubo de 1.5 ml, se le agrego 5  $\mu$ l de EDTA 125 mM pH 8.0 y 60  $\mu$ l de etanol absoluto. Se dio vórtex brevemente, se le hizo un spin corto, se incubo a temperatura ambiente por 30 min cubierto de la luz. Después de esto la mezcla se centrifugo a 13,000 g durante 20 min, se removió el sobrenadante con mucho cuidado y se lavó dos veces con 250  $\mu$ l de etanol al 70%. Para eliminar el sobrenadante se centrifugo a 13,000 g durante 5 min y se eliminó la totalidad del etanol.

### **7.14 Ensayo de restricción**

Para llevar a cabo la ligación de genes de interés al vector de expresión, los plásmidos pJET1.2/blunt-Ehtom1, pJET1.2/blunt-Ehvps23 y pGEX-6P-1 purificados se restringieron con Enzimas Fast Digest (Thermo Scientific). La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente 2  $\mu$ l de Buffer Fast Digest 10X, 1  $\mu$ g de DNA plasmidico, 1  $\mu$ l de cada enzima (EcoRI y BamHI) y se foro con agua libre de nucleasas hasta 20  $\mu$ l. La reacción se mezcló y se centrifugó a 13,000 g por 5 s, se incubó por 15 min a 37°C; la reacción se inactivo con una incubación a 80°C durante 5 min. Los productos de la digestión se analizaron en geles de agarosa al 1%, en solución TAE (Tris-Acetato-EDTA). Las bandas correspondientes a los fragmentos deseados se cortaron de los geles de agarosa y se purificaron igual a como se explicó anteriormente.

### **7.15 Ligación de los genes de interés al vector pGEX-6P-1**

Se realizó la ligación de los genes de interés digeridos y purificados al vector de expresión pGEX-6P-1 digerido con las mismas enzimas de restricción. La ligación se llevó a cabo con el kit "Rapid DNA ligation", para llevar a cabo esto se llevó a cabo la siguiente mezcla de reacción: 100 ng del vector pGEX-6P-1 linealizado, 300 ng del inserto, 4 µl del Buffer de ligación rápida 5X, 1 µl de la T4 DNA ligasa y se llevó a un volumen de 20 µl con agua libre de nucleasas. La mezcla se mezcló e incubó a 22°C por 5 min.

La mezcla de reacción se utilizó para transformar bacterias *E.coli* DH5α de la manera que ya se explicó anteriormente y se corroboró de igual manera la clonas transformantes por la reacción de PCR. Se purificaron los plásmidos con buena amplificación del gen de interés y se realizó la reacción de secuenciación para observar el correcto marco de lectura del mismo.

### **7.16 Inducción de las proteínas recombinantes GST-EhTom1 y GST-EhVps23**

Bacterias *E. coli* BL21 fueron transformadas con la construcción pGEX-6P-1-Ehtom1 o pGEX-6P-1-Ehvps23 para producir las proteínas recombinantes GST-EHTom1 y GST-EhVps23. La inducción se realizó de la siguiente manera: una colonia de la cepa transformada se inoculó en 5 ml de medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml) y las bacterias se crecieron a 170 rpm de agitación a una temperatura de 37°C. El cultivo se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 a 600 nm de longitud de onda, la inducción de la proteína recombinante se realizó por la adición de IPTG (isopropil-β-D-1-tio-galactosido) hasta una concentración de 0.1 mM e incubándose durante 3 y 6 h a 37 °C. Los cultivos se centrifugaron a 8,000 g durante 20 minutos, las pastillas se resuspendieron con 100 µl de amortiguador de muestra 5X (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, glicerol 26%, SDS 10%, azul de bromofenol 0.05% y 5 µl de β-mercaptoetanol). Las muestras se analizaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) al 10% (GST-EhTom1) y 8% (GST-EhVps23).

### **7.17 Análisis de la solubilidad de las proteínas recombinantes GST-EhTom1 y GST-EhVps23**

La biomasa de 100 ml de cultivo bacteriano inducido se resuspendió en 2.5 ml de Buffer de lisis (1 mM de EDTA, 300 mM de NaCl y 20 mM de Tris), después de esto la solución se sónico en frío utilizando un sonicador ultrasónico de punta Vibra-Cell Sonics<sup>R</sup> por cuatro ciclos de 30 segundos a una amplitud del 60%, alternando descansos de 30 segundos. El lisado celular se centrifugó a 13,000 g durante 15 min para separar la fracción soluble e insoluble. Cada una de las fracciones fueron diluidas en amortiguador de muestra 2X, se hirvieron por 5 min y se analizaron por corrimiento electroforético para identificar la fracción en la cual se localizaban las proteínas recombinantes.

### **7.18 Aislamiento de cuerpos de inclusión y solubilización**

La pastilla correspondiente a la fracción insoluble de 100 ml de cultivo se resuspendió en 3 ml de Buffer de aislamiento (2 M de urea, 20 mM de Tris, 0.5 M de NaCl y 2% de Triton X-100) frío y se sónico 4 veces en ciclos de 30 segundos a una amplitud de 60%, alternando descansos de 30 segundos. El lisado se centrifugó a 13,000 g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se descarta y la pastilla se resuspendió nuevamente en Buffer de aislamiento frío, después de esto se sónico nuevamente (4 ciclos de 30 segundos a una amplitud del 60%).

El cultivo se centrifugo nuevamente a 13,000 g durante 15 min. La pastilla se resuspendió en 5 ml de Buffer de solubilización (8 M de Urea, 20 mM de Tris y 0.5 M de NaCl). El cultivo se agito toda la noche a 37°C a 200 rpm, después de este tiempo se centrifugo a 13,000 g durante 20 min a 4°C. Cada una de las fracciones fueron diluidas en amortiguador de muestra 2X, se hirvieron por 5 min y se analizaron por corrimiento electroforético para identificar la fracción en la cual se localizaban las proteínas recombinantes.

### **7.19 Tinción de proteínas con azul de Coomassie**

Los geles fueron teñidos con solución de Coomassie (azul de Coomassie R-250 al 0.05%; metanol al 5% y ácido acético al 10%) durante 15 min. Posteriormente, los geles se destiñeron con una solución decolorante (metanol 5% y ácido acético al

7%), haciendo varios cambios de esta solución, hasta que se pudieron visualizar las bandas de las proteínas.

### **7.20 Electrotransferencia de proteínas e inmunodetección (ensayo tipo Western-blot)**

Los geles conteniendo las proteínas separadas por electroforesis se equilibraron previamente en solución de transferencia 1X (9 M de Tris; 1 M de Glicina; 20% de Metanol). Posteriormente se armó la unidad de transferencia tipo “sándwich”, teniendo en contacto el gel de acrilamida a la membrana de nitrocelulosa. El folder se colocó en una cámara de Electrotransferencia (Bio-Rad) que se llenó con solución de transferencia fría y se colocó en un baño de hielo. La transferencia se realizó a 400 mA, durante 80 min. Transcurrido este tiempo, los componentes de la cámara de electrotransferencia se desmontaron y la membrana se tiñó con solución de rojo de Ponceau (rojo de Ponceau al 0.1% y ácido acético al 1%), para verificar la correcta transferencia de las proteínas desde el gel hacia la membrana.

Posterior a esto la membrana se destiñó rápidamente con solución de transferencia e incubó con la solución bloqueadora (leche baja en grasa al 5% en PBS) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario (según sea el caso) disuelto en solución bloqueadora durante toda la noche a 4°C. A continuación, se realizaron 6 lavados con TBS-Tween al 1% durante 6 min, posterior a esto las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios (anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa, anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa y anti-IgG de rata acoplado a peroxidasa) utilizando una dilución 1:10,000 en leche al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 6 lavados con TBS-Tween al 1% de 6 minutos cada uno, la unión antígeno-anticuerpo se reveló con la adición de solución reveladora.

### **7.21 Extracción de las proteínas recombinantes de cuerpos de inclusión**

Debido a que nuestra proteína se encontraba en su gran mayoría dentro de cuerpos de inclusión se procedió a extraerlo de estos mediante la técnica de electroelución. Para esto se hicieron geles preparativos en poliacrilamida (10% para GST-EhTom1 y 8% para GST-EhVps23). La banda que correspondía a nuestra proteína recombinante se recortó y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Las bandas en gel de poliacrilamida se cortaron finamente y se colocó en un tubo para electroelución, este a su vez se montó en la cámara de electroelución. Se colocó buffer de corrida 1X y se corrió a 10 mA por cada tubo en la cámara por un tiempo aproximado de 1 hora. Después de este tiempo se descartó el buffer de corrida de la cámara y se colocó buffer de corrida nuevo sin SDS, posterior a esto se corrió nuevamente la cámara en las mismas condiciones por al menos media hora. Se desmontaron los tubos y se colectó la fracción correspondiente a las proteínas. Alícuotas de esta fracción fueron guardadas a 4°C hasta su uso. Estas proteínas se usaron en la titulación de los sueros inmunes de animales inmunizados para la obtención de anticuerpos policlonales contra nuestra proteína de interés.

### **7.22 Diseño de péptidos específicos para la inmunización**

El diseño de péptidos específicos para la inmunización y detección de las proteínas EhTom1 y EhVps23 se realizó empleando las bases de datos ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>) y BCPred (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict.html>). Estas bases de datos buscan los mejores péptidos candidatos a buenos inmunógenos a partir de los reportes experimentales que ya se han hecho.

Además, estos péptidos están conjugados a KLH (Hemocianina de lapa californiana) esto para mejorar la inmunogenicidad de los péptidos. Los péptidos fueron mandados a sintetizar a la empresa GL Biochem (Shangai) (<http://www.glschina.com/en/pro/first.htm>).

### **7.23 Generación de anticuerpos policlonales contra las proteínas EhTom1 y EhVps23**

Para la generación de anticuerpos contra la proteína EhTom1 se utilizaron 4 ratones machos de la cepa Balb/c de 4 a 6 semanas de edad, estos se inmunizaron con 80 µg de un péptido específico emulsificado en un volumen igual de adyuvante Titer-Max Gold (Sigma). El volumen total de la mezcla se repartió en ambas piernas (vía muscular) y en la espalda (vía subcutánea) de cada animal. Previo al primer reto se obtuvo una muestra de sangre de cada animal para obtener el suero preinmune, el cual se utilizó como control negativo. Los animales se inmunizaron cuatro veces utilizando la misma cantidad de proteínas recombinantes, con un intervalo de 14



días entre cada reto. La sangre se obtuvo 14 días después de cada reto y las muestras se incubaron a 37°C durante media hora para facilitar la separación del suero, posterior a la incubación se centrifugó a 2,000 g durante 15 min para recuperar el suero, el cual se separó en alícuotas que se almacenaron a -20°C hasta su uso. El análisis de la especificidad y la titulación de los anticuerpos policlonales anti-EhTom1, se realizaron mediante ensayos tipo *Wester-blot* usando extractos totales de amiba y la proteína recombinante.

Para el caso de la obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína EhVps23 se siguió el mismo esquema de inmunización, pero en su lugar se usaron ratas Wistar que se inocularon con 100 µg de un péptido específico. El análisis de la especificidad y la titulación de los anticuerpos policlonales anti-EhVps23, se realizaron mediante ensayos tipo *Wester-blot* usando extractos totales de amiba y la proteína recombinante.

#### **7.24 Extracción de proteínas totales de *E. histolytica***

De un cultivo de amibas se realizaron 3 lavados con PBS frío y se centrifugaron a 2,000 g durante 5 minutos entre cada lavado. Por cada 500,000 amibas se agregaron 900 µl de PBS y 100 µl de TCA. Se dejó a 4°C toda la noche y se centrifugó a 13,000 g durante 5 min. Después de esto se lavó la pastilla 5 veces con 1 ml de PBS frío. La pastilla se secó totalmente y se guardó a -70°C hasta su uso.

#### **7.25 Cuantificación de los mensajeros para EhVps23 y EhTom1**

Se extrajo RNA de *E. histolytica* como se indica anteriormente. El RNA se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop) a 260/280 nm.

#### **7.26 Ensayos de inmunofluorescencia**

Se cosecharon trofozoítos de *E. histolytica* se cosecharon en frío y se resuspendieron en medio TYI sin suero en una concentración de  $1.25 \times 10^5$  trofozoítos en 100 µl, la suspensión celular se colocó en cubreobjetos estériles contenidos en placas de cultivo, y se incubaron a 37 °C durante 20 minutos para permitir la adhesión de los trofozoítos al vidrio. Posteriormente, se añadieron 2 ml de TYI incompleto y se dejaron incubar 2 horas a 37°C. Pasado este tiempo se descartó el medio y se agregó sobre el cubreobjetos eritrocitos en una relación 1:20 diluidos en medios TYI incompleto, ambos tipos celulares se incubaron durante 2,

5, 10 min a 37 °C. Las preparaciones se lavaron con PBS a temperatura ambiente para eliminar los eritrocitos no adheridos ni fagocitados, posteriormente estos se fijaron con paraformaldehído al 4% a 37°C durante 30 1 h, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.2% durante 15 min. Se efectuó un lavado con PBS filtrado y se bloqueó durante 1 h con suero bovino al 10%.

A continuación se agregaron los anticuerpos primario policlonales (anti-EhVps23 y anti-EhTom1) o suero preinmune en una dilución 1:50 y las preparaciones se incubaron 6 h a 37 °C. Se efectuaron dos lavados con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 647 o anti-IgG de rata acoplados a FITC (isotiocianato de fluoresceína) a una dilución 1:100 durante 40 min a 37 °C. Nuevamente se realizaron dos lavados con PBS y para teñir los núcleos las muestras se incubaron con DAPI (decolorhidrato de 4',6-diamido-2-fenilindo) a una concentración de 0.25 mg/ml durante 6 min a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con PBS 1X estéril para eliminar el exceso de DAPI. Las muestras se colocarán sobre portaobjetos limpios y estériles, adicionando 10 µl de Vecta shield, finalmente las muestras se sellarán con barniz alrededor de cada cubreobjetos.

## VIII. Resultados

### 8.1 Identificación *in silico* de los elementos Tom1 y Vps23 en *Entamoeba histolytica*

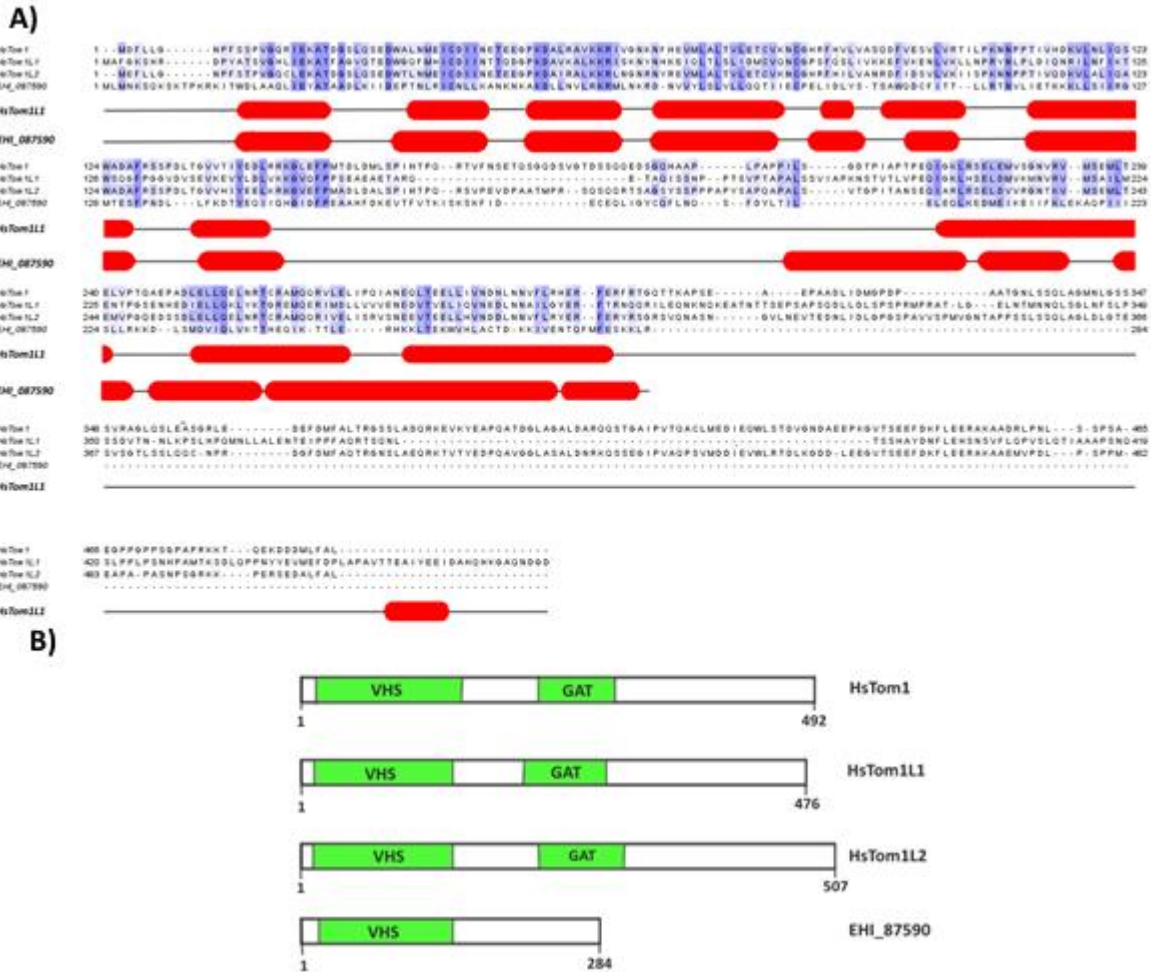
En el humano así como en *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito que la maquinaria ESCRT es necesaria para el direccionamiento de moléculas cargo, para que esto se lleve a cabo es necesaria la acción secuencial de los complejos ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III (Williams & Urbe, 2007). Para el caso de la ameba se han logrado identificar experimentalmente los elementos del complejo ESCRT-III (Avalos-Padilla *et al.*, 2015; Tesis de Doctorado Avalos-Padilla 2016), así como elementos accesorios de la maquinaria (Banuelos *et al.*, 2012; Lopez-Reyes *et al.*, 2010). Pero en la actualidad se carecen de ensayos *in silico* extensos así como de ensayos *in vitro* para la identificación de los elementos de los complejos que inician la maquinaria. Por lo que nos propusimos a estudiar a los complejos ESCRT-0 y ESCRT-I en la ameba. Para elegir a un candidato de elemento del complejo ESCRT-0 y ESCRT-I abordamos la búsqueda *in silico*, de las proteínas hipotéticas de los complejos ESCRT-0 y ESCRT-I en *E. histolytica*, para esto utilizamos como molde las secuencias de las proteínas en humano y *Saccharomyces cerevisiae*, obtenidas de la base de datos KEGG. De estos resultados (datos no mostrados) se obtuvo como mejor candidato un posible homólogo de la proteína Vps23 (ESCRT-I), sin embargo no se obtuvieron proteínas con una alta probabilidad a ser homólogos de la maquinaria ESCRT-0. Análisis previos ( ) han mostrado que en la gran mayoría de organismos carecen de los elementos de los complejos ESCRT-0, por lo que se proponen mecanismos diferentes que cumplen sus funciones, con esta premisa se ha propuesto ( ) a elementos de la familia Tom1 como posibles elementos ancestrales del complejo ESCRT-0. Dado estos antecedentes nos propusimos la búsqueda de homólogos de proteínas de la familia Tom1 en *E. histolytica* usando la misma estrategia que utilizamos anteriormente, en esta búsqueda encontramos un posible homólogo de Tom1 en *Entamoeba histolytica*.

La secuencia de las proteínas Tom1, Tom1L1 y Tom1L2 de humano fue alineada con la secuencia de aminoácidos de la proteína EhTom1 hipotética (No. acceso: EHI\_087590) (Figura 4A). Esta proteína posee una identidad del 20% con la Tom1L1 de humano (No. acceso hsa: 10040). La longitud de la posible Tom1 es

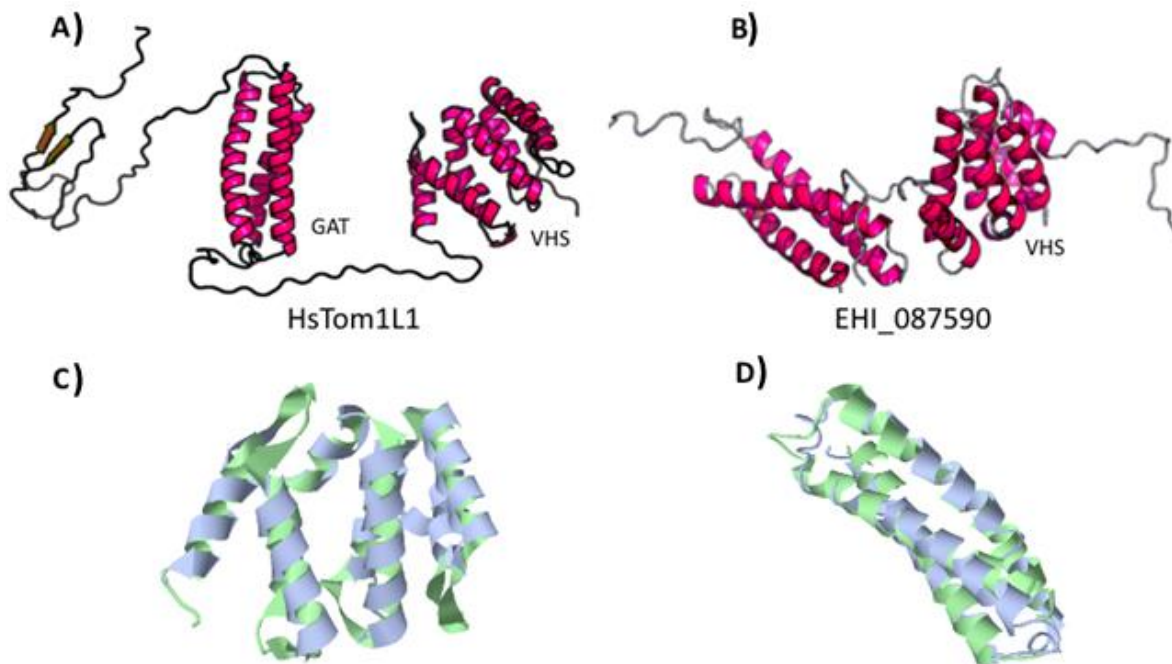
menor a la de humano, teniendo esta última 476 aa, en tanto que la de ameba posee 284 residuos. A pesar de la identidad muy baja que presenta la proteína de la ameba, la predicción de la estructura secundaria muestra un gran parecido entre la estructura del amino terminal (8 alfa hélices) de la proteína EHI-087590 y Tom1L1 (Figura 4A), difiriendo un poco en la parte carboxilo terminal. Además al hacer una comparación de los dominios funcionales (Figura 4B) presentes estas proteínas observamos que ambas poseen en su extremo amino terminal al dominio VHS el cual permite la asociación con fosfolípidos de membrana (*Blanc et al., 2009*) y a la proteína Hrs (ESCRT-I) (Puertollano 2005). Sin embargo la proteína EHI\_087590 carece del dominio GAT, el cual permite su asociación a ubiquitina (*Blanc et al., 2009*) (*Shiba et al., 2004*).

Finalmente hicimos una predicción de la estructura terciaria de estas proteínas, observándose por lo menos tres dominios estructurales para el caso de Tom1L1 (Figura 5A) y dos en el caso de la proteína EHI\_087590 (Figura 5B), al hacer un alineamiento estructural encontramos una identidad estructural del 98% (Figura 5C) entre el dominio VHS de ambas moléculas y una identidad del 82% (Figura 5D) entre el dominio GAT de Tom1L1 y un dominio estructural de 3 alfa hélices presente en la proteína EHI\_087590.

Dado estos resultados consideramos a la proteína EHI\_087590 de *E. histolytica* homólogo a la proteína Tom1L1 de humano, por lo cual se le nombrara a partir de este momento como EhTom1.



**Figura 4. Comparación entre las proteínas de la familia Tom1 de humano con un posible homólogo en *Entamoeba histolytica*.** A) Se muestra el alineamiento entre las proteínas de la familia Tom1 y un candidato a esta proteína en *E. histolytica*, el alineamiento se realizó con el programa M-coffe, se muestra la similitud en una escala de azul. En la parte inferior del alineamiento se muestra la predicción de la estructura secundaria de Tom1L1 y la proteína en *E. histolytica* con la base de datos JPred, donde se muestran las alfas hélices en ovalos rojos. B) Dominios funcionales encontrados en las proteínas de la familia Tom1 en humanos y el posible miembro en *E. histolytica*, el análisis se realizó con la bases de datos SMART y la herramienta Motif, los dominios se presentan en rectángulos verdes. En las proteínas de la familia Tom1 de humano se encontró la presencia de los dominios VHS y GAT, para el caso de EHI\_087590 solo se observó la presencia del dominio VHS.

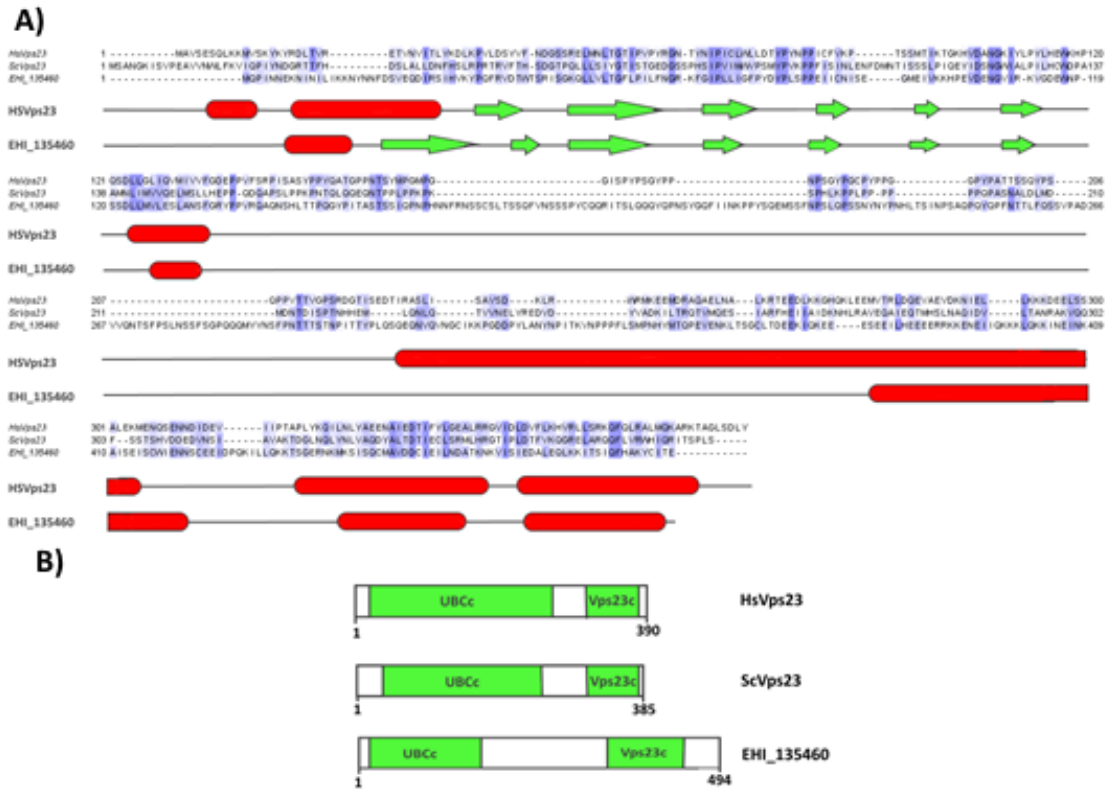


**Figura 5. Modelaje de la estructura terciaria de las proteínas HsTom1L1 y EHI\_087590.** A) y B) Muestran la estructura terciaria completa de las proteínas HsTom1L1 y EHI\_087590 respectivamente, la predicción de la estructura se obtuvo usando la base de datos RaptorX, se muestran las hélices alfa en rojo y las láminas beta en amarillo. Para la proteína HsTom1L1 se muestran los dominios estructurales que corresponden a los dominios VHS y GAT, para la proteína EHI\_087590 se muestran dos dominios estructurales, uno de ellos caracterizado como el dominio VHS. C) Se muestra el alineamiento estructural del dominio VHS de ambas proteínas. D) Alineamiento estructural entre el dominio GAT de HsTom1L1 y un dominio estructural no identificado en EHI\_087590. Alineamientos realizados por la herramienta "Structure Alignment" de RaptorX.

Las secuencias de las proteínas Vps23 del humano (HsVps23) y Vps23 de *Saccharomyces cerevisiae* fue alineada con la secuencia de aminoácidos de la proteína EhVps23 hipotética (No. Acceso: EHI\_135460) (Figura 6A). Esta proteína posee una identidad del 25% con la Vps23 de humano (No de acceso hsa: 7251). La longitud del posible homólogo a Vps23 es mayor que la del humano, teniendo esta última 390 aa, en tanto que la de amiba posee 494 residuos. Debido a la identidad baja que presenta la proteína de la amiba, se realizó la predicción de la estructura secundaria (Figura 6A), donde se encontró que ambas proteínas tienen gran parecido, ya que en su parte amino tienen alrededor de seis láminas betas con una hélice alfa a los extremos, por otro lado en la parte carboxilo presentan tres alfa hélices. Siguiendo el esquema anterior, se procedió a hacer una comparación de los dominios funcionales de ambas proteínas (Figura 6B), de donde se observa que ambas proteínas presentan los dominios UBCc (o UEV) que permiten la interacción con ubiquitina (Pornillos *et al.*, 2002), además ambas proteínas presentan el dominio Vps23 core el cual permite la interacción de los elementos del complejo ESCRT-I (Teo *et al.*, 2006).

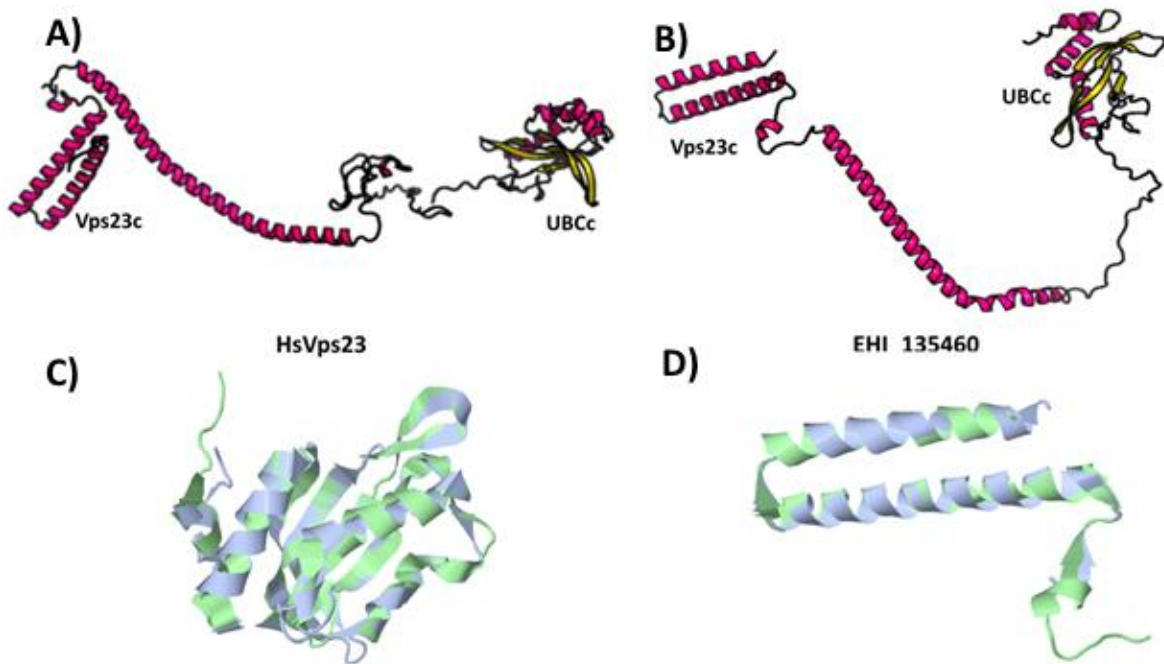
Finalmente hicimos una predicción de la estructura terciaria de estas proteínas, donde se observa un gran parecido entre ambas estructuras, ya que ambas presentan tres dominios estructurales (Figura 7A y 7B), al realizar el alineamiento estructural, encontramos una identidad estructural del 94% (Figura 7C) entre los dominios UEV de ambas moléculas, y una identidad del 88% (Figura 7D) entre los dominios Vps23 core de ambas proteínas.

Dado estos resultados consideramos a la proteína EHI\_135460 de *E. histolytica* homólogo a la proteína Vps23 de humano, por lo cual se le nombrará a partir de este momento como EhVps23.



**Figura 6. Comparación entre las proteínas Vps23 de diferentes especies con un posible ortólogo en *E. histolytica*.** A) Se muestra el alineamiento entre las proteínas HsVps23, ScVps23 y EHI\_135460. El alineamiento se realizó con el programa M-coffe y se muestra la similitud en escala de azul. En la parte inferior del alineamiento se representa la predicción de la estructura secundaria de HsVps23 y EHI\_135460 realizada por la base de datos JPred, donde se muestran las alfa hélices en óvalos rojos y las láminas beta en flechas verdes. B) Dominios funcionales presentes en las proteínas HsVps23, ScVps23 y EHI\_135460, análisis realizado con la base de datos SMART y la herramienta Motif, los dominios se presentan en rectángulos verdes. En las tres proteínas analizadas están presentes los dominios UBCc y Vps23c.





**Figura 7. Modelaje de la estructura terciaria de las proteínas HsVps23 y EHI\_135460.**  
 A) y B) Muestran la estructura terciaria completa de las proteínas HsVps23 y EHI\_135460 respectivamente, la predicción de la estructura se obtuvo usando la base de datos RaptorX, se muestran las hélices alfa en rojo y las láminas beta en amarillo. Para ambas proteínas se muestran los dominios estructurales que corresponden a los dominios UBCC y Vps23c. C) y D) Alineamiento estructural de los dominios UBCC y Vps23c de ambas proteínas, realizado por la herramienta "Structure Alignment" de RaptorX.

## 8.2 Diseño de oligonucleótidos específicos y PCR

Debido a la necesidad de la obtención de las proteínas recombinantes para la titulación de los anticuerpos contra las proteínas EhTom1 y EhVps23 se decidió hacer la clonación de los genes respectivos, para lo cual se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de estos genes, además, a estos oligonucleótidos se les agregaron las secuencias necesarias para que los productos pudieran ser reconocidos por las enzimas de restricción EcoRI y BamHI (Tabla 2).

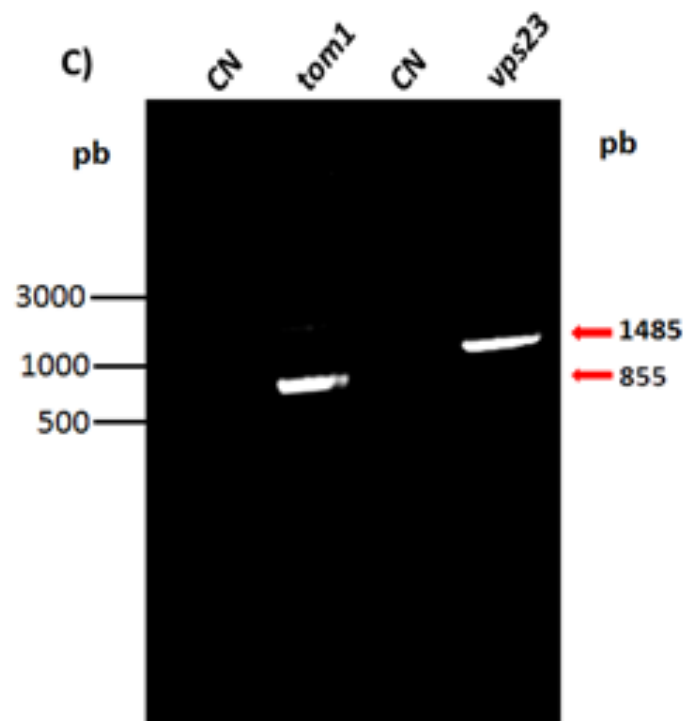
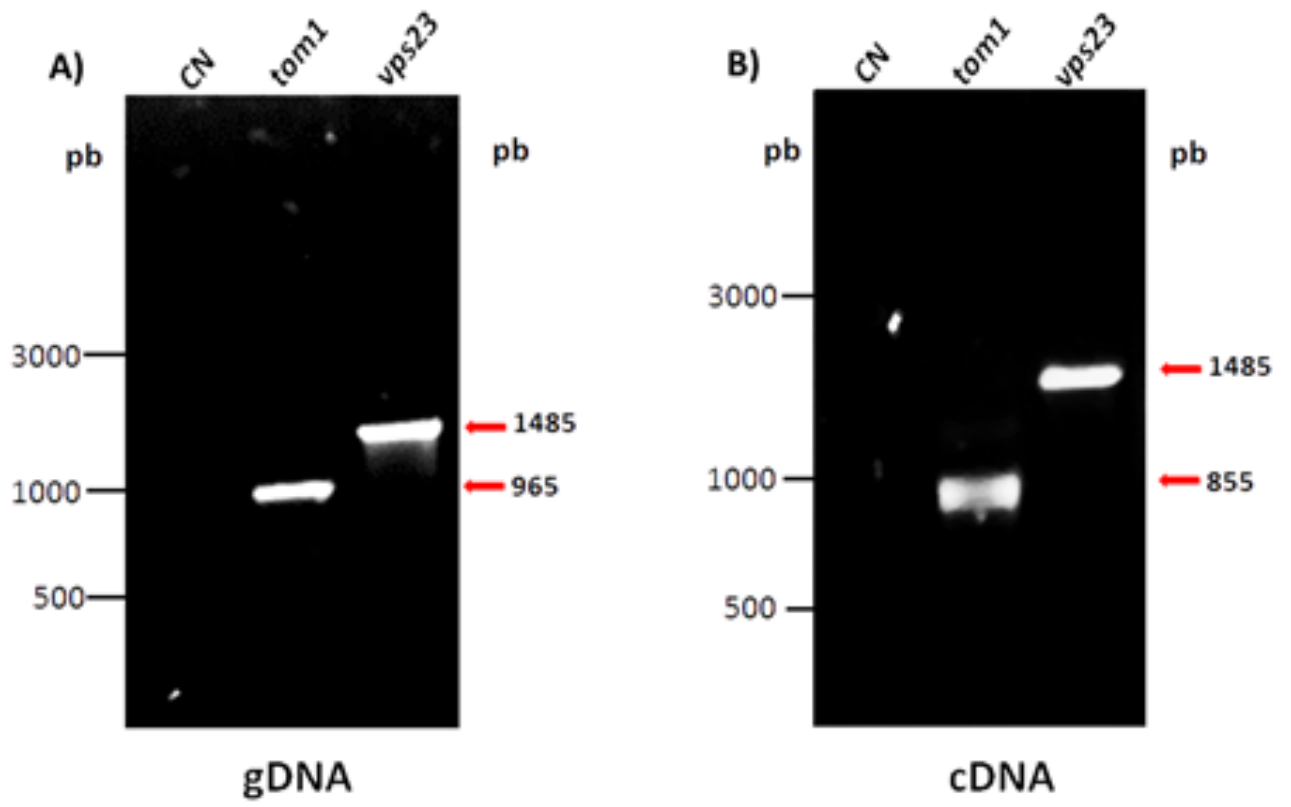
**Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación del gen Ehvtom1 y Ehvps23**

Gen		Secuencia	Tm °C
<i>Ehtom1</i>	Sentido	5'- GGGGATCCATGTTAATGAATAAATCCCAAAAATCTAA AACAC-3'	60
	Antisentido	5'- GGGAATTCCTTATCTTAATTTCTTTGATTCAAACATAAAT TGTGT-3'	60
<i>Ehvps23</i>	Sentido	5'- GGGGATCCATGCAACCTATAAACAATGAAAAGAATAT TAACA-3'	60
	Antisentido	5'- GGGAATTCCTTATTTCAGTTATGCAATACTTTGCATGAA- 3'	60

Estos oligonucleótidos se diseñaron con la herramienta "PCR Oligo Marker" para amplificar específicamente los genes completos que codifica para las proteínas EhTom1 y EhVps23, a estos oligos se les incorporaron secuencias reconocidas por endonucleasas, que permitieron la clonación directa del inserto en el vector de clonación. Nucleótidos subrayados con línea continua señalan la secuencia reconocida por la enzima BamHI; los nucleótidos subrayados con línea punteada señalan la secuencia reconocida por la enzima EcoRI.

Al analizar los genes que codifican a nuestras proteínas de interés se encontró que el gen Ehtom1 posee en su secuencia un intrón, por lo que para la amplificación de este gen para la clonación se decidió partir de cDNA, por otro lado para el caso de el gen Ehvps23 al no poseer intrones se decidió partir de gDNA. Primero para revisar que los pares de oligonucleótidos especificaran un solo producto se procedió a realizar reacciones de PCR convencionales, utilizando como molde gDNA (Figura 8A) se obtiene amplificadas específicos de alrededor de 965 pb para el caso de Ehtom1 y de 1485 pb para el gen Ehvps23, resultados que concuerdan con los ya reportados en la base de datos AmoebaDB; por otro lado al utilizar cDNA (Figura 8B) como molde se obtienen amplificadas de 855 pb para Ehtom1 y de 1485 pb para Ehvps23, resultado igualmente concordantes con lo ya reportado en la base de datos.

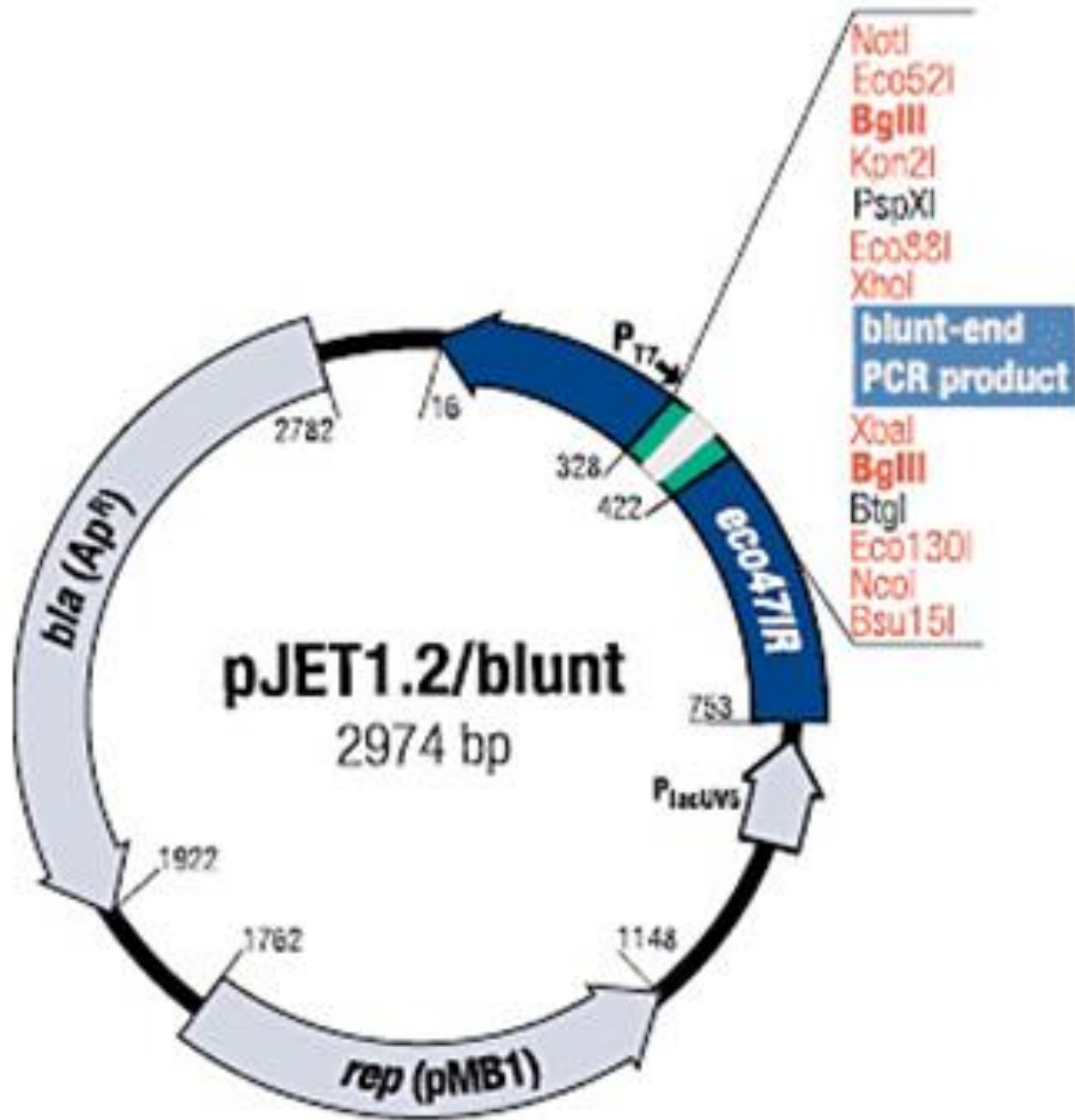
Ya corroborado la amplificación específica con los pares de oligonucleótidos diseñados, además, del correcto tamaño de los productos, se procedió a realizar la amplificación de los genes correspondientes con la enzima de alta fidelidad (Figura 8C), esto, para seguir con los pasos de la clonación. De igual manera En esta amplificación se muestran los tamaños de 855 pb para Ehtom1 y 1485 pb para Ehvps23.



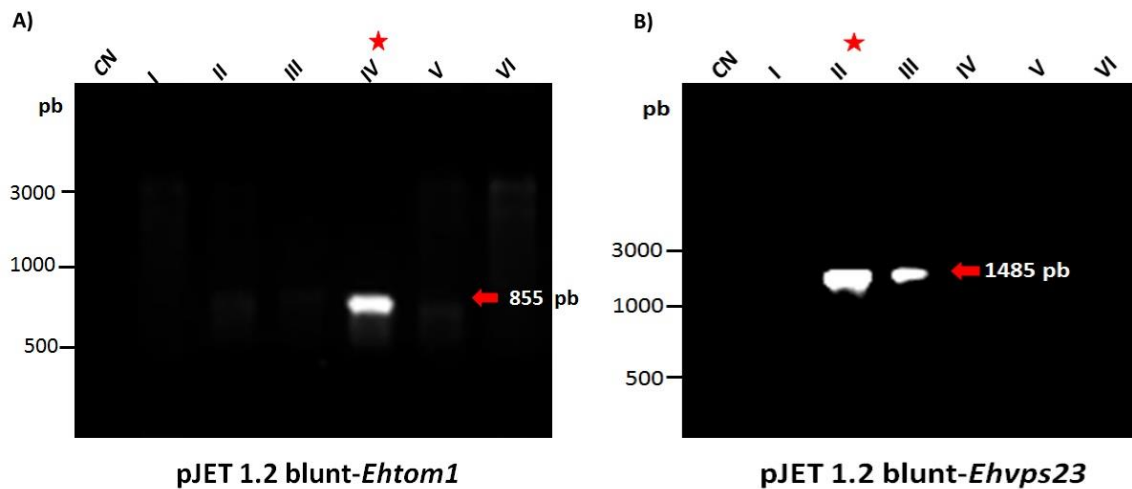
**Figura 8. Amplificación de los genes completos *Ehtom1* y *Ehvps23* con oligonucleótidos específicos.** En todos los casos los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1%. A) Amplificación de los genes *Ehtom1* y *Ehvps23* con oligonucleótidos específicos usando como molde gDNA. Carril 1: control negativo. Carril 2: Fragmento amplificado en la PCR utilizando los oligonucleótidos para el gen *Ehtom1*. Carril 3: Fragmento amplificado utilizando los oligonucleótidos para el gen *Ehvps23*. B) Amplificación de los genes *Ehtom1* y *Ehvps23* con oligonucleótidos específicos usando como molde cDNA. Carril 1: control negativo. Carril 2: Fragmento amplificado en la PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para el gen *Ehtom1*. Carril 3: Fragmento amplificado utilizando los oligonucleótidos para el gen *Ehvps23*. C) Amplificación de los genes *Ehtom1* y *Ehvps23* con la polimerasa de alta fidelidad. Carril 1: control negativo de la amplificación de *Ehtom1*. Carril 2: Fragmento amplificado en la PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para el gen *Ehtom1*, usando como molde cDNA. Carril 3: control negativo de la amplificación de *Ehvps23*. Carril 4: Fragmento amplificado en la PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *Ehvps23*, usando como molde gDNA.

### **8.3 Ligación de los genes de interés al vector de subclonación**

Para la subclonación de nuestros genes de interés se utilizó el vector de clonación pJET1.2/blunt (Figura 9) el cual permite la unión directa de productos de PCR, además de una selección rápida debido a la presencia de un gen letal. Después de la ligación de los amplificadores se transformaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  y se procedió a la selección de clones transformantes. La selección de clones transformante se efectuó mediante ensayos de PCR, donde se utilizó como molde, crecimiento de las diferentes clones en medio líquido. Para el caso de las clones transformantes con el vector pJET1.2/blunt-*Ehtom1* se obtuvo que solo la clona No. 4 (Figura 10A) presenta niveles considerables de nuestro gen de interés. Por otro lado para las bacterias transformadas con el vector pJET1.2/blunt-*Ehvps23* se encontró que las clones No. 2 y 3 (Figura 10B) poseían buenos niveles en la expresión de nuestro gen de interés. Las construcciones seleccionadas para los subsecuentes pasos, fueron secuenciadas para descartar las posibles mutaciones, utilizando los oligonucleótidos específicos diseñados para su amplificación, además para completar la secuenciación de toda la secuencia se utilizaron los oligonucleótidos sugeridos por el kit "CloneJET PCR". No se observaron mutaciones en la secuencia de nuestros genes de interés (Apéndice No. 1), además con base a estos resultados se construyeron los modelos de las construcciones realizadas (Apéndice No. 2)



**Figura 9. Mapa del vector pJET1.2/blunt.** Se utilizó para la subclonación directa del gen Ehtom1 y Ehvps23, a partir de los extremos romos dejados por la polimerasa de alta fidelidad. Se muestra además la presencia del gen de resistencia a ampicilina y el gen letal eco47IR los cuales favorecen la selección de bacterias transformantes.

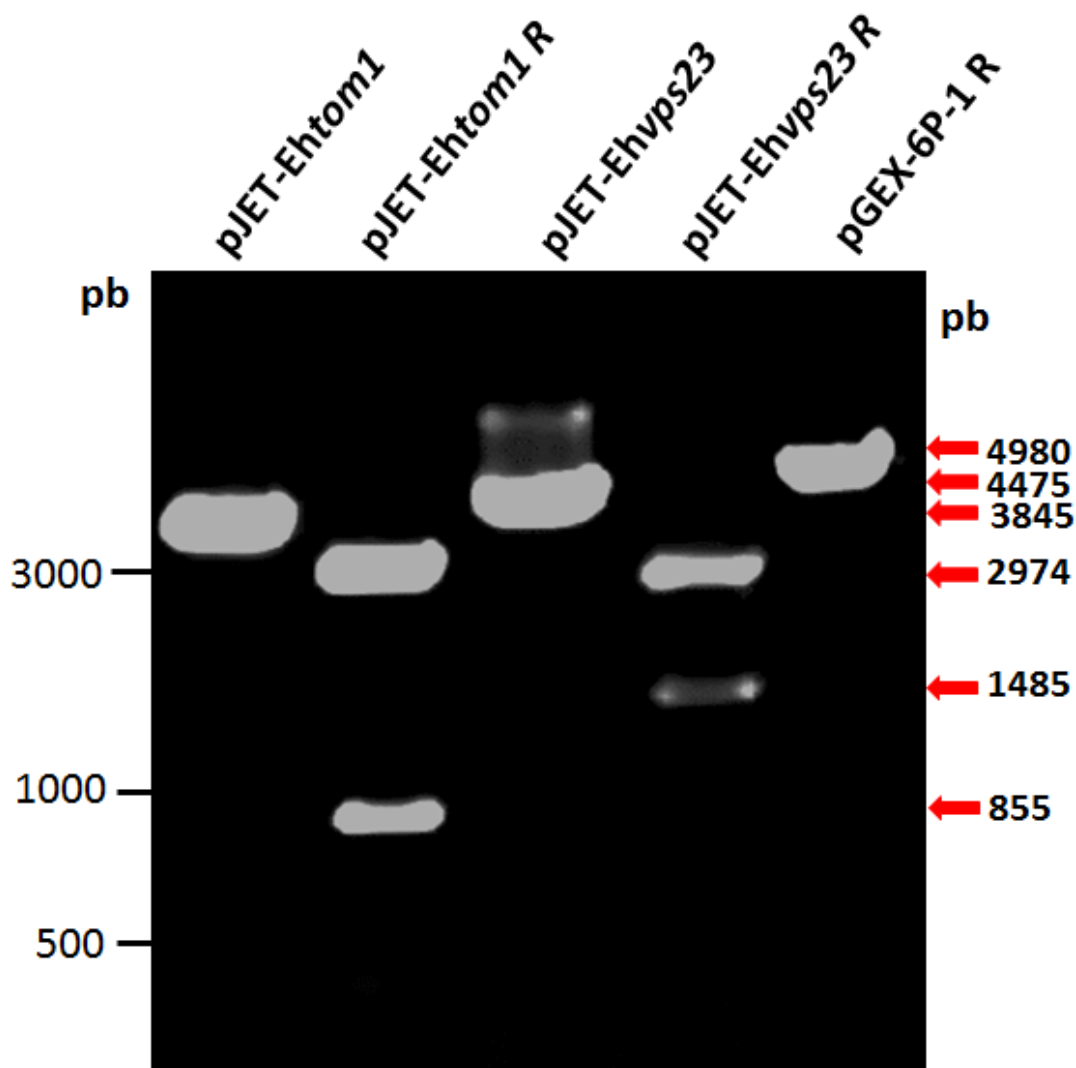


**Figura 10. Selección de clonas transformantes con el vector de subclonación recombinante con el gen de interés.** A) Amplificación del gen *Ehtom1* con oligonucleótidos específico utilizando como molde el cultivo de las distintas clonas transformantes con el plásmido pJET1.2/blunt-*Ehtom1*. Carril 1: Control negativo. Carril 2-Carril 6: Fragmento amplificado utilizando como molde las distintas clonas transformantes. B) Amplificación del gen *Ehvps23* con oligonucleótidos específicos utilizando como molde el cultivo de las distintas clonas transformantes con el plásmido pJET1.2/blunt-*Ehvps23*. Carril 1: Control negativo. Carril 2- Carril 6: Fragmento amplificado utilizando como molde las distintas clonas transformantes.



#### **8.4 Digestión de los plásmidos para la ligación del gen de interés al vector de expresión**

Los vectores pJET1.2/blunt-*Ehtom1* y pJET1.2/blunt-*Ehvps23* purificados fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI (Figura 11) para la liberación del inserto, de igual manera el vector de expresión pGEX-6P-1 fue digerido con las mismas enzimas de restricción para poder ligar nuestros insertos en este plásmido. La linealización del plásmido pJET1.2/blunt-*Ehtom1* mostro una migración aproximada de 3845 pb, lo que concuerda con lo esperado, de igual forma al realizar la digestión con ambas enzimas se logró observar la liberación de un fragmento de aproximadamente 855 pb, el cual corresponde al tamaño del gen *Ehtom1*, se puede observar un segundo fragmento de alrededor de 2974 pb el cual corresponde al vector pJET1.2/blunt. Por otro lado, al realizar la linealización de la construcción pJET1.2/blunt-*Ehvps23* se observó que este poseía un tamaño de aproximado de 4475 pb, el cual corresponde a lo esperado, cuando se realizó una digestión con las enzimas ya mencionada se observó la liberación de un fragmento de aproximadamente 1485 pb (correspondiente al gen *Ehvps23*) y un fragmento de mayor tamaño (2974 pb) el cual corresponde al vector pJET1.2/blunt. Finalmente la restricción del plásmido pGEX-6P-1 con ambas enzimas de restricción mostro un tamaño aproximado de 4980 pb, cabe mencionar que el fragmento liberado no es observable, ya que la separación entre ambos sitios de restricción en el plásmido (Figura 12) es de solo de 3 pb.



**Figura 11. Digestión de los plásmidos pJET1.2/blunt- Ehtom1, pJET1.2blunt-Ehvps23 y pGEX-6P-1 con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI.** Los vectores con los genes de interesa si como el vector de expresión fueron digeridos para llevar acabo la ligación de los genes de interés en el vector de expresión, la digestión fue realizada con las enzimas de digestión “Fast Digest” (Thermo Scientific). Carril 1: Vector pJET1.2/blunt-Ehtom1 linealizado con la enzima EcoRI. Carril 2: Vector pJET1.2/blunt-Ehtom1 digerido con las enzimas BamHI y EcoRI. Carril 3: Vector pJET1.2/blunt-Ehvps23 linealizado con la enzima EcoRI. Carril 4: Vector pJET1.2/blunt-Ehvps23 digerido con las enzimas BamHI y EcoRI.

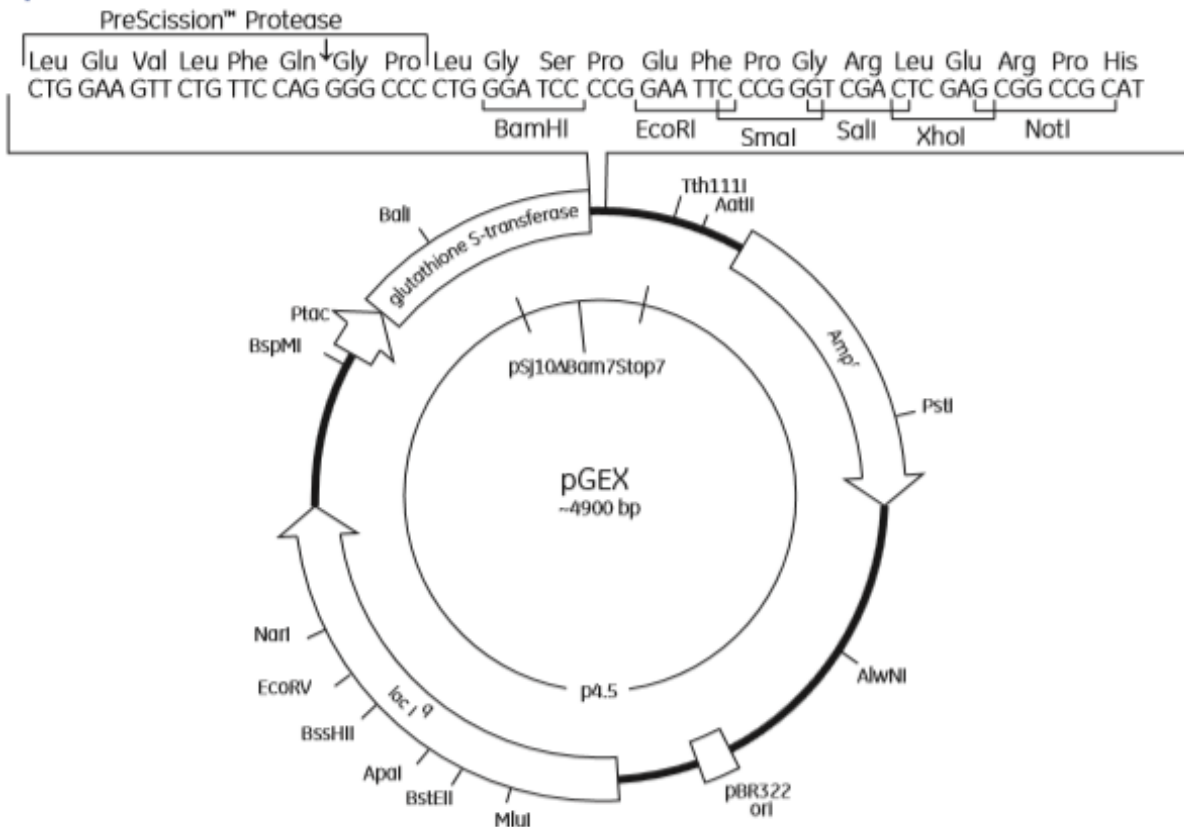
### **8.5 Ligación de los genes de interés al vector de clonación**

Para la producción de nuestras proteínas recombinantes se realizó la ligación de los *Ehtom1* y *Ehvps23* al vector de expresión pGEX-6P-1. El mapa del vector se representa en la Figura No. 12 y se muestra los sitios reconocidos para las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, además de la presencia de una secuencia que codifica para un fragmento de la proteína GST, la cual servirá como la etiqueta de nuestras proteínas recombinantes.

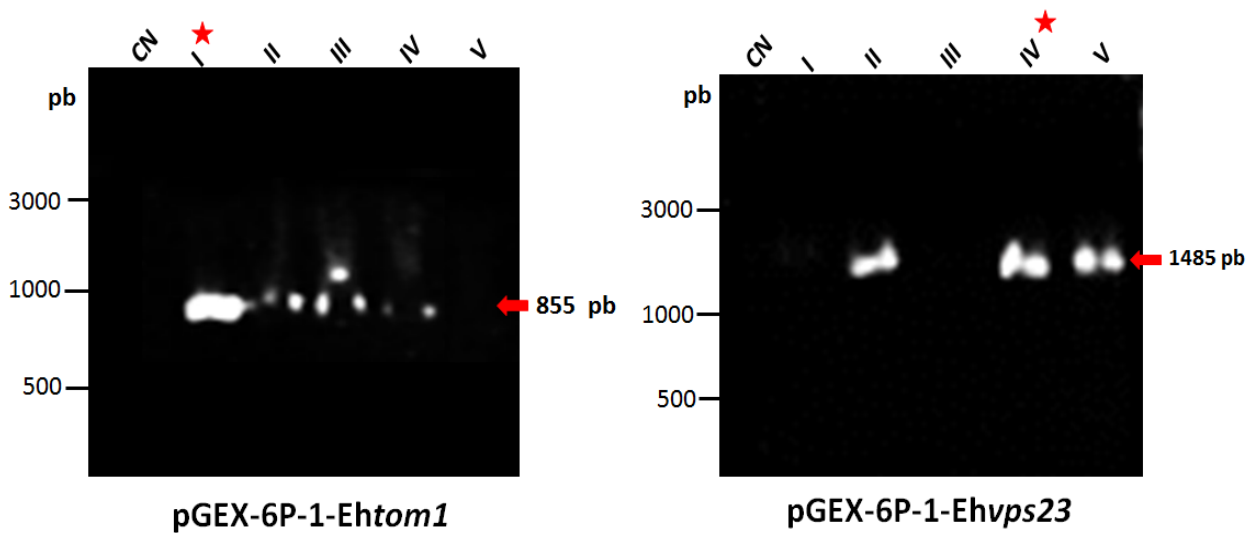
Después de realizar la ligación ya mencionada se transformaron bacterias *E. coli* DH5a para la expansión del plásmido, igual que en la anterior transformación se eligió la mejor clona transformantes por ensayos de PCR con los oligonucleótidos específicos para nuestro gen de interés utilizando como molde crecimiento bacteriano de las distintas clonas en medio líquido. Para las clonas transformantes con la construcción pGEX-6P-1 se obtuvo que la clona No I, fue la que poseía una buena amplificación de nuestro gen de interés. Por otro lado, de las clonas transformadas con la construcción pGEX-6P-1, la No IV poseía una buena amplificación de nuestro gen *Ehvps23*.

Las construcciones de estas clonas fueron purificadas y se le realizó una reacción de secuenciación para corroborar el correcto marco de lectura de nuestros genes *Ehtom1* y *Ehvps23*, no se observó errores en el marco de lectura (Apéndice No 4), con estos resultados se elaboraron los modelos de las construcciones realizadas (Apéndice No. 5). Con estas construcciones ya purificadas se transformaron bacteria *E.coli* BL21 para la inducción de las proteínas recombinantes.

## pGEX-6P-1



**Figura 12. Mapa del vector pGEX-6P-1.** Este vector se utilizó para la expresión de los genes *Ehtom1* y *Ehvps23*, para la ligación se digirió el plásmido con las enzimas EcoRI y BamHI. Se muestra además la presencia del gen de resistencia a ampicilina y la secuencia que codifica para la proteína GST que sirvió como etiqueta para la proteína recombinante, con lo que se favoreció su reconocimiento y purificación.



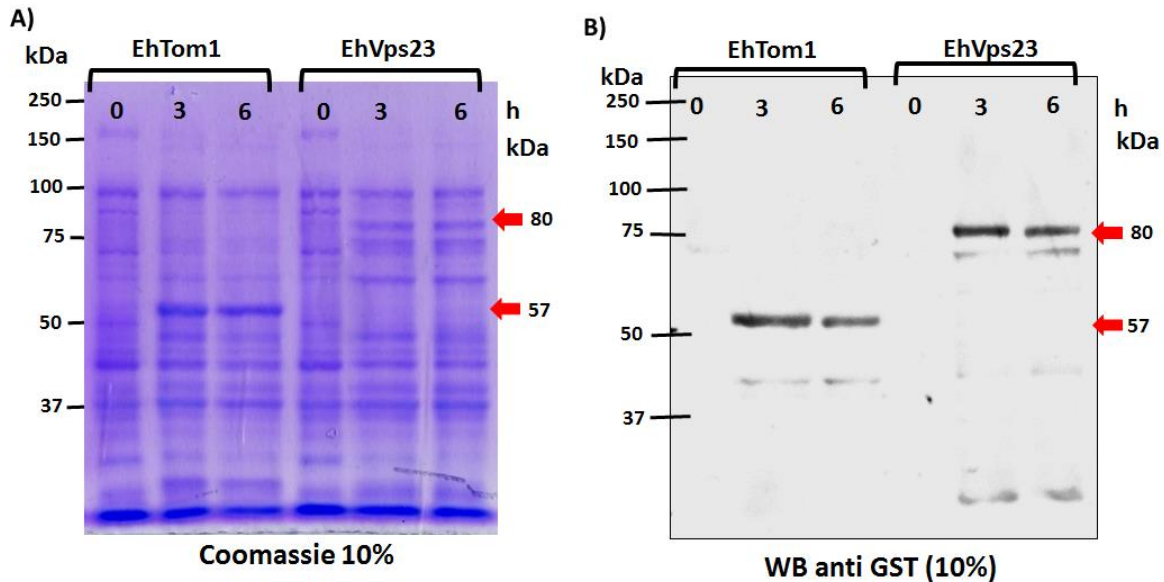
**Figura 13. Selección de clonas transformantes con el vector de clonación recombinante con el gen de interés.** A) Amplificación del gen *Ehtom1* con oligonucleótidos específico utilizando como molde el cultivo de las distintas clonas transformantes con el plásmido pGEX-6P-1-Ehtom1. Carril 1: Control negativo. Carril 2- Carril 6: Fragmento amplificado utilizando como molde las distintas clonas transformantes. B) Amplificación del gen *Ehvps23* con oligonucleótidos específicos utilizando como molde el cultivo de las distintas clonas transformantes con el plásmido pGEX-6P1-Ehvps23. Carril 1: Control negativo. Carril 2- Carril 6: Fragmento amplificado utilizando como molde las distintas clonas transformantes.

### **8.6 Inducción de las proteínas GST-EhTom1 y GST-EhVps23**

En bacterias *E.coli* BL21 transformadas con la construcción pGEX-6P-1-*Ehtom1* y pGEX-6P-1-*Ehvps23* se realizó la inducción por 3 y 6 horas a 37°C de las proteínas recombinantes GST-EhTom1 y GST-EhVps23. Los resultados de la inducción de la proteína GST-EhTom1 teñidos por Coomassie (Figura No. 14A) muestran la presencia de una banda de alrededor de 57 kDa desde las 3 horas de inducción, esta banda parece concordar con una banda que es reconocida con anticuerpos anti-GST (Figura No. 14B) en el WB realizado, esta banda también se observa desde las 3 horas de inducción.

En los resultados de la inducción de la proteína GST-EhVps23 teñidos por Coomassie (Figura 14A) se pudo observar la presencia de una banda de alrededor de 80 kDa desde las tres horas de inducción, la cual también fue reconocida por los anticuerpos anti-GST (Figura 4B). Cabe mencionar que el peso encontrado para ambas bandas es muy cercanos al peso esperado, para el caso de GST-EhTom1 de 56.24 kDa y 79.34 para el caso de GST-EhVps23.

Debido a que se observó la inducción de ambas proteínas recombinantes desde las tres horas, para los experimentos posteriores se efectuó la inducción de las proteínas recombinantes por 3 horas a 37°C.



**Figura 14. Inducción de las proteínas GST-EhTom1 y GST-EhVps23 en bacteria *E.coli* BL21.** Las bacterias *E. coli* BL21 transformadas con los vectores pGEX-6P1-EhTom1 y pGEX-6P1-EhVps23 se les indujo la expresión de las proteínas recombinante en medio LB suplementado con IPTG 0.1 mM incubándose a 37°C. A) Gel teñido con Coomassie de los distintos tiempos de inducción de las proteínas GST-EhTom1 y GST-EhVps23. Carril 1-3 inducción de la proteína GST-EhTom1. Carril 4-6 inducción de la proteína GST-EhVps23. Carril 1 y 4 bacterias sin inducción. Carril 2 y 5 bacterias con 3 horas de inducción a 37°C. Carril 3 y 6 bacterias con 6 horas de inducción a 37°C. B) Western-blot, se incubo con anti GST en cabra 1:10,000 como anticuerpo primario 1 hora a 37°C; como anticuerpo secundario se utilizó anti IgG de cabra 1:10,000. Los carriles se cargaron igual que en el gel anterior. En flechas rojas se muestran las bandas de las proteínas recombinantes.

### **8.7 Fraccionamiento de las distintas etapas en la obtención de la proteína GST-EhTom1 y GST-EhVps23**

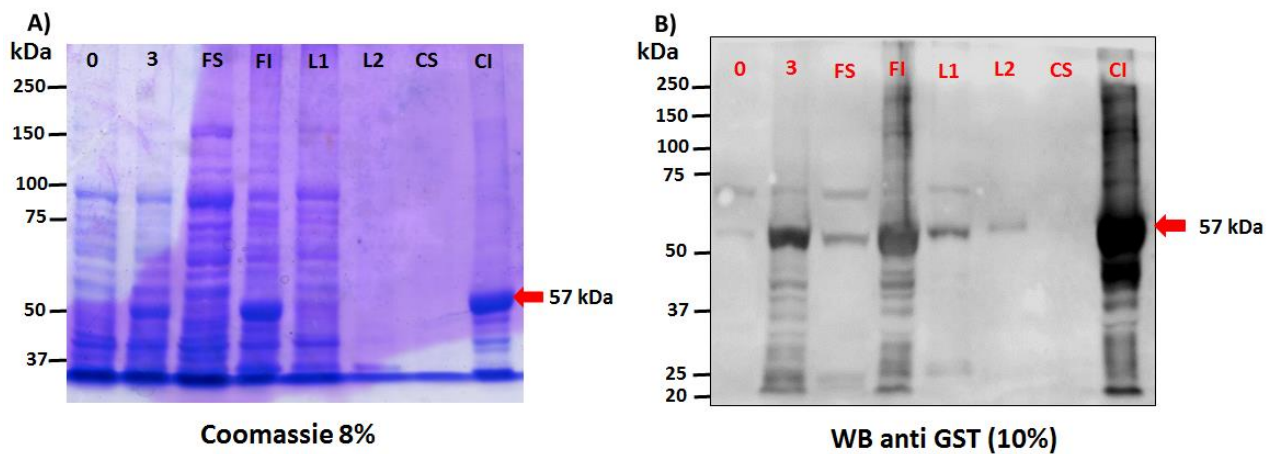
Con la finalidad de purificar las proteínas GST-Ehtom1 y GST-EhVps23, se analizó la solubilidad de la proteína. Las bacterias BL21 transformadas e inducidas con IPTG durante 3 horas a 37°C se lisaron y se formaron las fracciones solubles (FS) e insoluble (FI), posterior a esto a las fracciones insolubles se les practicaron lavados (L1 y L2) para la obtención de cuerpos de inclusión (CI), y la solubilización de los mismos (CS).

Los resultados del fraccionamiento de las bacterias productoras de la proteína GST-EhTom1 teñidos por Coomassie (Figura 15A) muestran que la banda anteriormente identificada de un peso aproximado de 57 kDa está presente en la fracción insoluble y no son solubilizados por el tratamiento a los cuerpos de inclusión, quedando después del tratamiento en cuerpos de inclusión. Este mismo comportamiento se observó al utilizar anticuerpos contra la etiqueta de GST (Figura 15B).

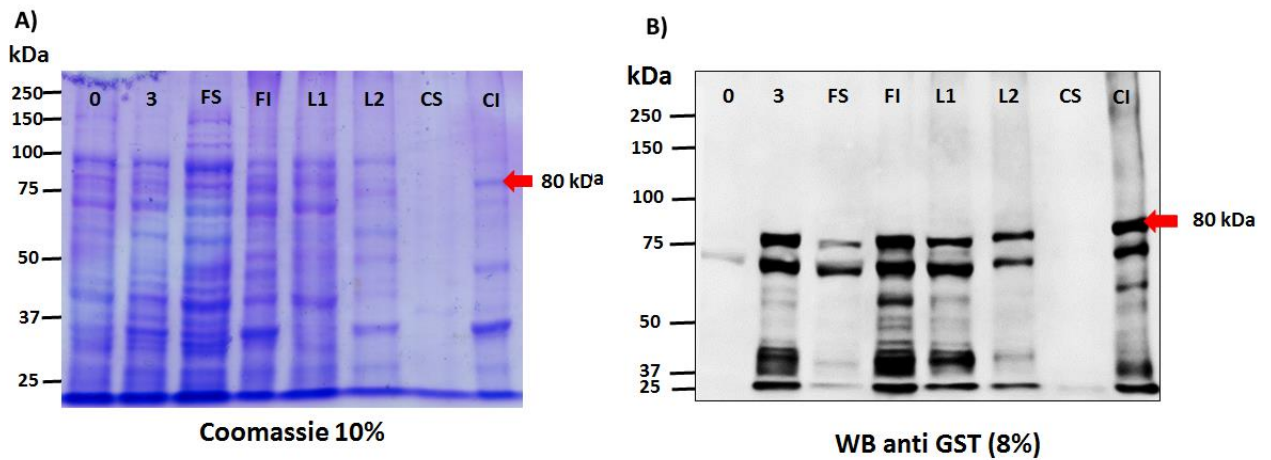
De igual manera al realizar el fraccionamiento de las bacterias productoras de la proteína GST-EhVps23 teñidos por Coomassie (Figura 15B) muestran que la banda identificada como la proteína recombinante (aproximadamente de 80 kDa) se encuentra principalmente en la fracción insoluble, lavado uno, lavado dos y no es solubilizado por el tratamiento de los cuerpos de inclusión, quedando después del tratamiento en estos últimos. Este comportamiento fue confirmado al usar anticuerpos contra la etiqueta de GST (Figura 15B) sobre las mismas fracciones.

Debido a que en ambos caso la gran mayoría de las proteínas recombinantes se encontraron en cuerpos de inclusión, se abordó la extracción de esta proteína por la técnica de electroelución.





**Figura 15. Fraccionamiento en la obtención de la proteína GST-EhTom1.** Se realizó la inducción de la proteína GST-EhTom1 por la incubación de 3 horas a 37°C en medio LB adicionado con IPTG 0.1mM, se realizó un fraccionamiento para la identificación de en qué parte permanecía nuestra proteína de interés. 0= Bacterias sin inducir. 3=Bacterias con una inducción de 3 horas a 37°C. FS= Fracción soluble. FI= Fracción insoluble. L1= Lavado 1. L2= Lavado 2. CS= Solubilizado de los cuerpos de inclusión. CI= Cuerpos de inclusión finales. A) Corrimiento en gel de poliacrilamida al 8% teñido con Coomassie. B) Western-blot se incubo con anti GST en cabra 1:10,000 como anticuerpo primario 1 hora a 37°C; como anticuerpo secundario se utilizó anti IgG de cabra 1:10,000. Las flechas rojas señalan las bandas que representan a la proteína recombinante GST-EhTom1.



**Figura 16. Fraccionamiento en la obtención de la proteína GST-EhVps23.** Se realizó la inducción de la proteína GST-EhVps23 por la incubación de 3 horas a 37°C en medio LB adicionado con IPTG 0.1mM, se realizó un fraccionamiento para la identificación de en qué parte permanecía nuestra proteína de interés. 0= Bacterias sin inducir. 3=Bacterias con una inducción de 3 horas a 37°C. FS= Fracción soluble. FI= Fracción insoluble. L1= Lavado 1. L2= Lavado 2. CS= Solubilizado de los cuerpos de inclusión. CI= Cuerpos de inclusión finales. A) Corrimiento en gel de poliacrilamida al 10% teñido con Coomassie. B) Western-blot se incubó con anti GST en cabra 1:10,000 como anticuerpo primario 1 hora a 37°C; como anticuerpo secundario se utilizó anti IgG de cabra 1:10,000. Las flechas rojas señalan las bandas que representan a la proteína recombinante GST-EhVps23.

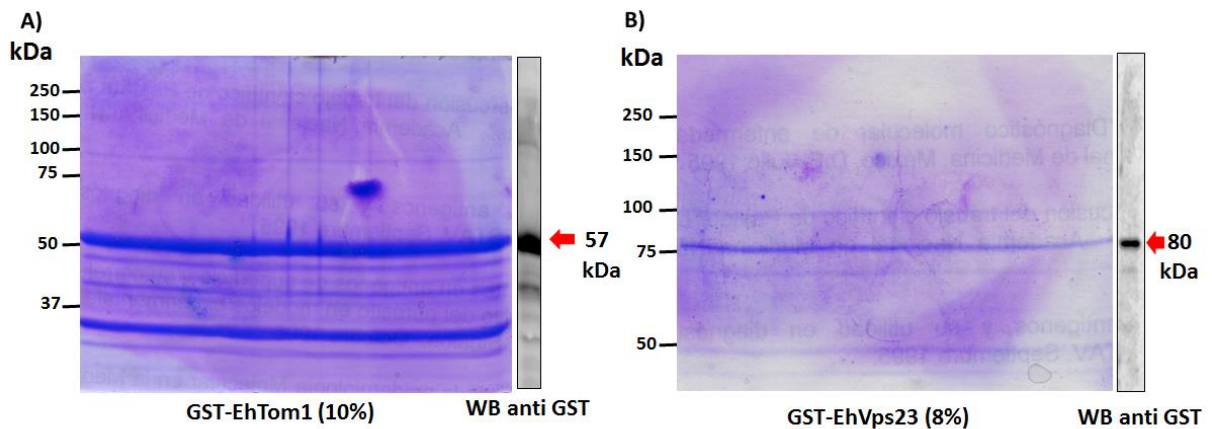
## **8.8 Extracción de las proteínas GST-EhTom1 y GST-EhVps23 de cuerpos de inclusión**

Para llevar a cabo la técnica de electroelución para la obtención de las proteínas recombinantes se corrieron la fracción correspondiente a cuerpos de inclusión en geles de poliacrilamida, los geles fueron teñidos con Coomassie (Figura 17), las bandas correspondientes al peso de 57 kDa para GST-EhTom1 (Figura 17A) y de 80 kDa para la proteína GST-EhVps23 (Figura 17B) fueron cortadas del gel de poliacrilamida y se guardaron a 4°C hasta su uso.

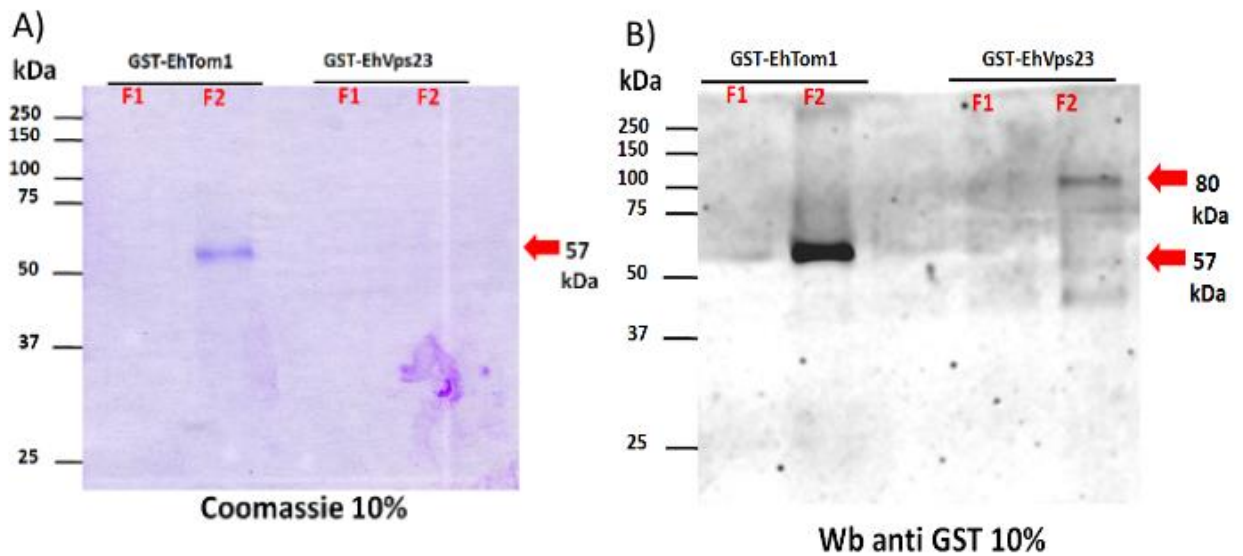
Para corroborar la identidad de la proteína en la banda cortada se realizó un ensayo tipo WB usando anticuerpo anti GST, en estos se corroboró la identidad de la fracción cortada en ambos casos (Figura 17A y 17B).

Se realizó la técnica de electroelución, la cual consta de por medio de una corriente eléctrica desplazar las proteínas contenidas en los geles a un pequeño compartimento, donde quedaran resuspendidas en un volumen pequeño del amortiguador de corrida. Las fracciones obtenidas de la técnica de electroelución fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE al 10% y teñidas con azul de Coomassie (Figura 18A). Adicionalmente estas fracciones fueron analizadas mediante *Western-blot* (Figura 18B). Se puede observar en el caso de las fracciones de GST-EhTom1 solo la fracción No. 2 mostro una banda en el gel, banda que es reconocida por los anticuerpo anti GST y presenta un peso molecular aproximado de 57 kDa. De las fracciones correspondientes a GST-EhVps23 no se lograron observar bandas en el gel teñido por azul de Coomasie, sin embargo la fracción No. 2 presento reconocimiento al realizar el WB, este reconocimiento fue de aproximadamente 80 kDa, lo que identifica a esta banda como la proteína GST-EhVps23.

Dado estos resultados para la titulación de sueros inmunes que se hicieron posteriormente, se usó la proteína recombinante purificada GST-EhTom1. Por otro lado debido a las cantidades mínimas que se obtuvieron de la proteína GST-EhVps23, se usaron cuerpos de inclusión que tenían a la proteína ya mencionada.



**Figura 17. Geles preparativos de cuerpos de inclusión con las proteínas GST-EhTom1 y GST-EhVps23.** Geles preparativos generados para la extracción de las proteínas recombinantes de los cuerpos de inclusión. A) Gel preparativo para los cuerpos de inclusión con la proteína GST-EhTom1, gel al 10% de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. Del lado derecho se observa un WB realizado para la correcta identificación de la banda perteneciente a GST-EhTom1, se usó como anticuerpo primario anti GST en cabra 1:10,000 1 h a 37°C y como anticuerpo secundario anti IgG de cabra acoplado a peroxidasa 1:10,000 1 h a temperatura ambiente. B) Gel preparativo para los cuerpos de inclusión con la proteína GST-EhVps23, gel al 8% de poliacrilamida teñido con Coomassie. Del lado derecho se observa un WB realizado para la correcta identificación de la banda perteneciente a GST-EhVps23, se usó como anticuerpo primario anti GST en cabra 1:10,000 1 h a 37°C y como anticuerpo secundario anti IgG de cabra acoplado a peroxidasa 1:10,000 1h a temperatura ambiente. En flechas rojas se muestran las bandas de las proteínas recombinantes que se cortaron del gel.



**Figura 18. Resultados de la electroelución de las proteínas GST-EhTom1 y GST-EhVps23.** A) Las fracciones de la electroelución de las proteínas recombinantes GST-Ehtom1 y GST-EhVps23 se analizaron mediante electroforesis SD-PAGE al 10% teñida con azul de Coomassie. B) Ensayo tipo WB utilizando como anticuerpo primario anti GST en cabra 1:10,000 1 hora a 37°C y como anticuerpo secundario anti IgG de cabra conjugado a hrp 1:10,000 1 hora a temperatura ambiente. GST- EhTom1: fracción 1 (F1), fracción 2 (F2); GST-EhVps23: fracción 1 (F1), fracción 2 (F2).

### 8.9 Obtención de anticuerpos policlonales contra las proteínas EhTom1 y EhVps23

Para la obtención de anticuerpos policlonales contra nuestras proteínas EhTom1 y EhVps23 se diseñaron péptidos específicos con carácter específico. El diseño se realizó en dos bases de datos BCPred y ABCpred, ambas bases de datos nos mostraron para cada proteína un péptido de 16 aa, con una alta puntuación (con base a datos ya reportados para cada base de datos (Tabla 3).

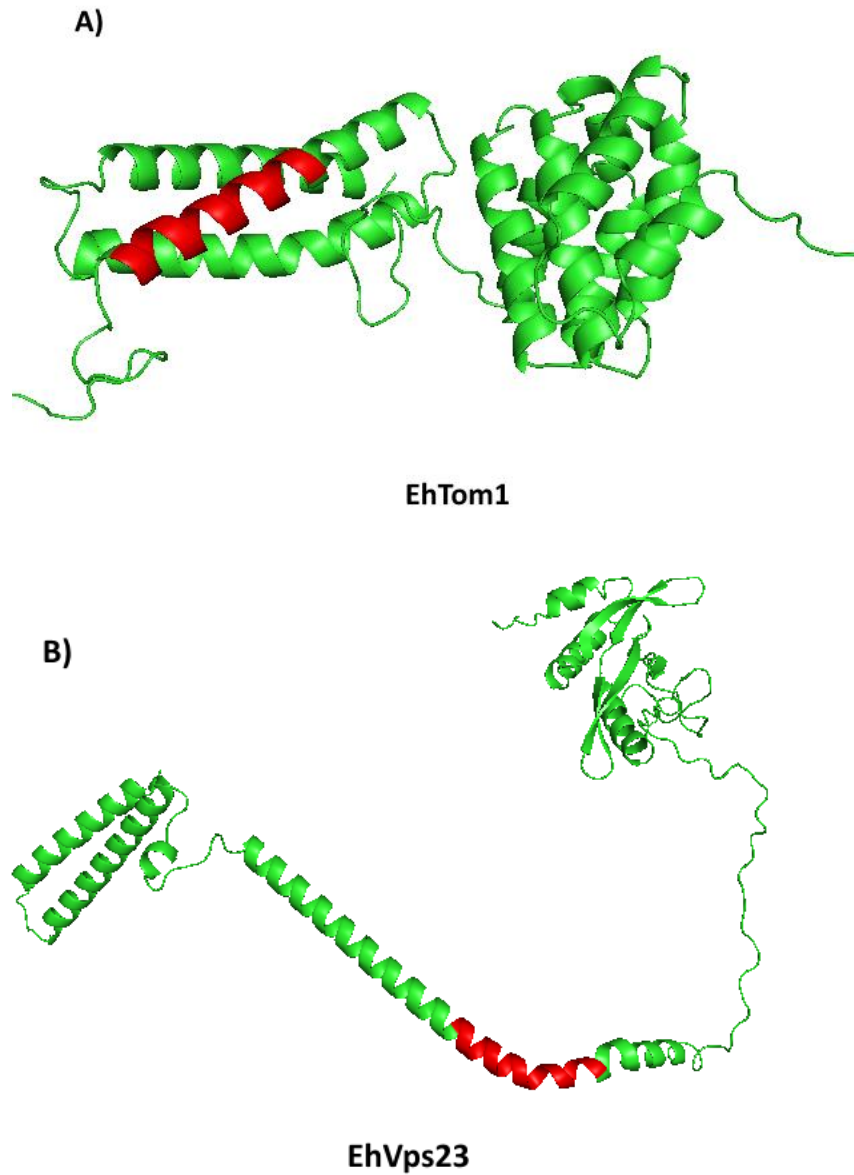
Para evitar que el péptido estuviera obstruido en la conformación final de la proteína, se analizó la posición de estos dentro de la predicción de la estructura tridimensional que se generó con anterioridad. Para el caso del péptido para la proteína EhTom1 se observa que se encuentra expuesto y forma parte del dominio estructural parecido a GAT (Figura 18A). El péptido diseñado para la proteína EhVps23 se expuesta localizada en una hélice alfa entre el dominio UEV y Vps23 core (Figura 18B).

Finalmente a ambos péptidos se solicitaron conjugados en su parte amino terminal a la proteína hemocianina de lapa californiana (KLH), esto para mejorar las características inmunogenicas del péptido.

**Tabla 3. Secuencia de los péptidos específicos utilizados para inmunización contra las proteínas EhTom1 y EhVps23**

Proteína	Tamaño (aa)	Secuencia	Posición	Score (BCPred)	Score (ABCPred)
EhTom1	284	<b>KLH-EQIKTTLERHKKLTEK</b>	244	0.94	0.96
EhVps23	494	<b>KLH-QKEEESSEILHEEEER</b>	372	1	0.84

Estos péptidos se seleccionaron con las bases de datos BCPred y ABCPred para la inmunización específica contra las proteínas EhTom1 y EhVps23. Además estos péptidos están conjugados a KLH (Hemocianina de lapa californiana) para mejorar la inmunogenicidad.

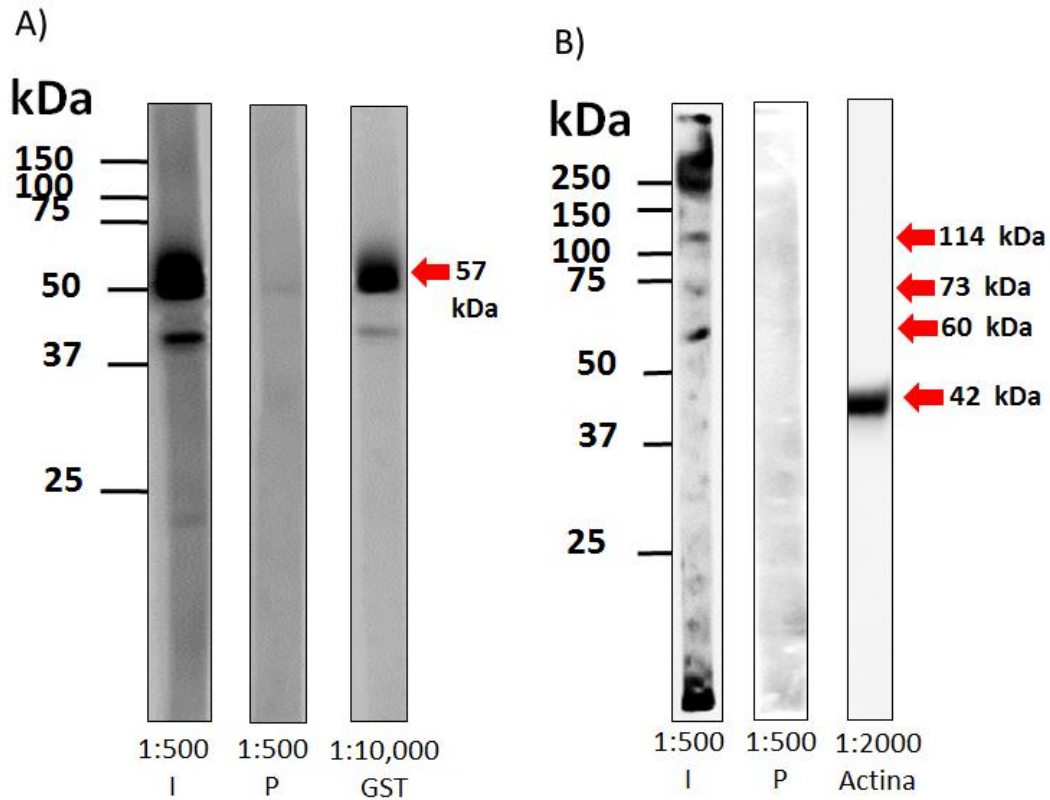


**Figura 18. Localización del péptido utilizado para inmunizar dentro de la estructura terciaria.** Para el correcto diseño de los péptidos para inmunización se comprobó que estos estuvieran expuestos en la estructura terciaria de las moléculas. La estructura terciaria fue generada por la base de datos RaptorX, el péptido utilizado para la inmunización se muestra en rojo.

### **8.10 Análisis de la especificidad y titulación del suero inmune contra la proteína EhTom1 y GST-EhTom1**

Se inmunizaron ratones Balbc con el péptido específico para la obtención de anticuerpos contra la proteína EhTom1, los sueros inmunes de estos animales fueron extraídos cada dos semanas, y fueron probados mediante el uso de las proteínas recombinantes anteriormente producidas. De estos análisis se encontró que desde la segunda inmunización (4 semanas) estaban presentes títulos contra la proteína recombinante. Al utilizar este suero contra la proteína recombinante GST-EhTom1 (Figura 19A) se observó el reconocimiento solo en el suero inmune de una banda con un peso aproximado de 57kDa, la cual fue reconocida también utilizando anticuerpos contra GST, por lo que esta banda corresponde a la proteína recombinante. Por otro lado al utilizar el suero inmune sobre proteínas totales de *E. histolytica* (Figura 19B) encontramos el reconocimiento específico de tres bandas con pesos aproximados de 114, 73 y 60 kDa, al utilizar anticuerpos dirigidos contra la actina en los extractos totales de amiba, se reconoce una banda con un peso aproximado de 42 kDa.

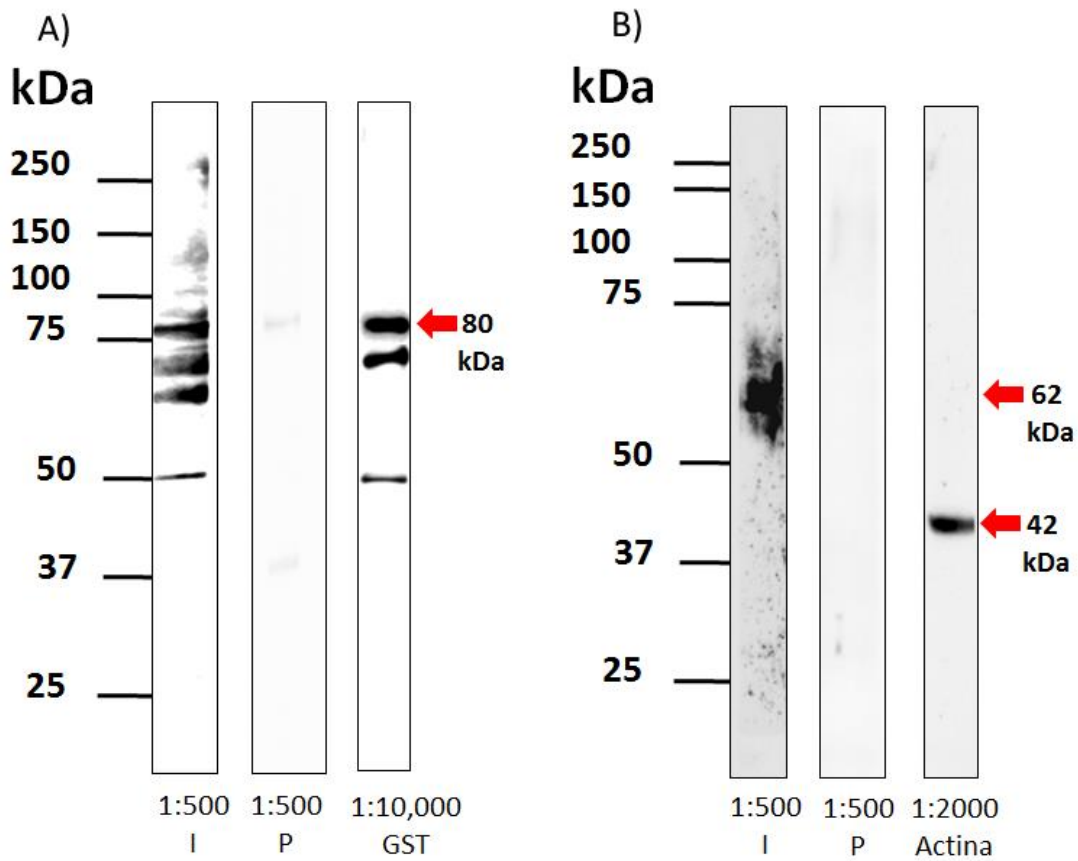




**Figura 19. Estudio del reconocimiento de sueros inmunes de ratones inmunizados con un péptido específico para EhTom1.** El suero inmune de ratones inmunizados fue analizado para comprobar el reconocimiento de la proteína recombinante GST-EhTom1 (A) y de las proteínas EhTom1 (B) en extractos totales de amiba. Se usaron en ambos casos el suero inmune (I) en una dilución 1:500 o suero preinmune a una dilución 1:500 (P). Como controles positivos se utilizaron anticuerpos anti-GST 1: 10,000 para las proteínas recombinantes y anti-actina 1:2000 para los extractos totales.

### **8.11 Análisis de la especificidad y titulación del suero inmune contra la proteínas EhVps23**

Se inmunizaron ratas Wistar con un péptido específico para la obtención de anticuerpos contra la proteína EhVps23, los sueros inmunes de estos animales fueron extraídos cada dos semanas, y fueron probados mediante el uso de las proteínas recombinantes anteriormente producidas. Se encontró que desde la segunda inmunización (4 semanas) están presentes títulos contra nuestra proteína recombinante. Al utilizar este suero contra la proteína recombinante GST-EhVps23 (Figura 20A) se observó el reconocimiento solo en el suero inmune de una banda con un peso aproximado de 80 kDa, la cual fue reconocida también utilizando anticuerpos contra GST, por lo que esta banda corresponde a la proteína recombinante. Por otro lado al utilizar el suero inmune sobre proteínas totales de *E. histolytica* (Figura 20B) encontramos el reconocimiento de una banda con un peso aproximado de 62 kDa, al utilizar anticuerpos dirigidos contra la actina en los extractos totales de amiba, se reconoce una banda con un peso aproximado de 42 kDa.

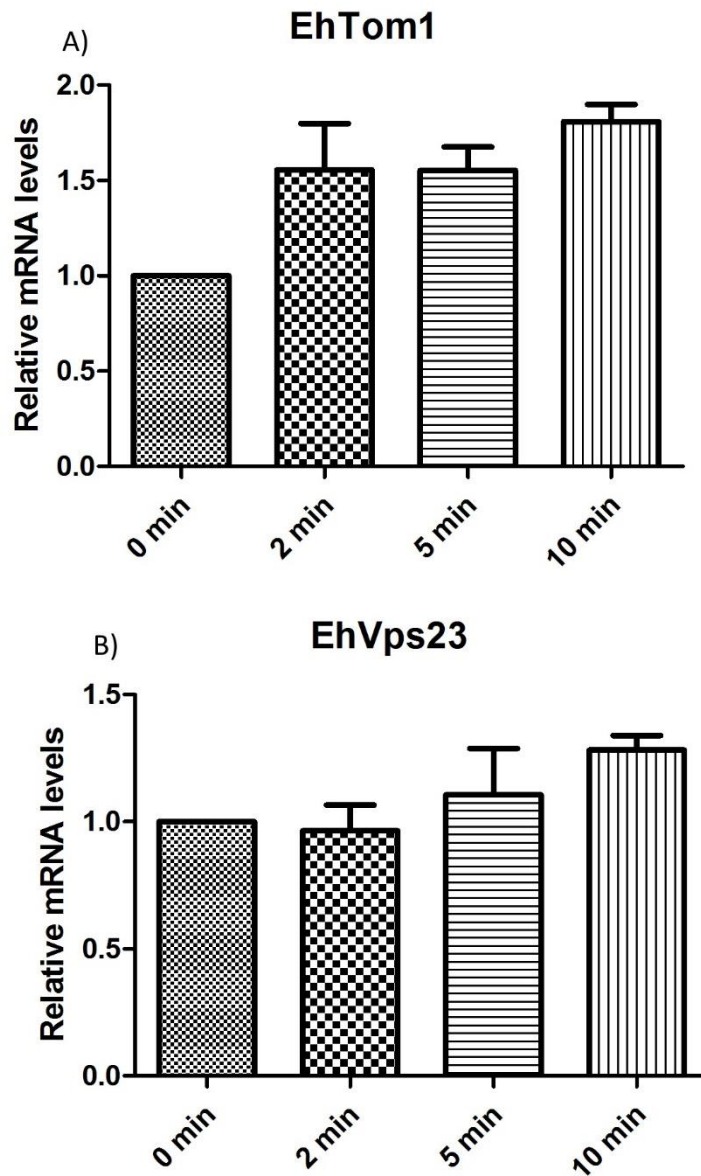


**Figura 20. Estudio del reconocimiento de sueros inmunes de ratones inmunizados con un péptido específico para EhVpa23.** El suero inmune de ratones inmunizados fue analizado para comprobar el reconocimiento de la proteína recombinante GST-EhVps23 (A) y de la proteína EhVps23 (B) en extractos totales de ameba. Se usaron en ambos casos el suero inmune (I) en una dilución 1:500 o suero preinmune a una dilución 1:500 (P). Como controles positivos se utilizaron anticuerpos anti-GST 1: 10,000 para las proteínas recombinantes y anti-actina 1:2000 para los extractos totales

### **8.12 Análisis de cambios en los niveles de mensajero de los genes *Ehtom1* y *Ehvps23* durante la eritrofagocitosis**

Se realizó la medición de la expresión de los genes *Ehtom1* y *Ehvps23* en una cinética de eritrofagocitosis a tiempos cortos, para esto se utilizaron ensayos de RT-qPCR. Estos resultados fueron normalizados en primer lugar con la expresión del gen 40s ribosomal, en segundo lugar se normalizaron con respecto a la expresión en estado basal (tiempo 0).

Para el caso del gen *Ehtom1* se logra observar un ligero aumento en la expresión relativa desde los 2 minutos de interacción con eritrocitos, sin embargo, al ser estos resultados preliminares y carecer de análisis estadísticos, los resultados no son aun consistentes. En la expresión relativa del gen *Ehvps23* no se observan grandes cambios, pero al igual que en el caso anterior, es necesario realizar más replicas biológicas, así como de aplicar el análisis estadístico respectivo.



**Figura 21. Expresión relativa de los genes *Ehtom1* y *Ehvps23* durante eventos de eritrofagocitosis.** Valores relativos de la expresión de los genes determinada por ensayos de RT-qPCR, usando una relación 1:20 (amibas: eritrocitos) en el evento de eritrofagocitosis. A) Valores obtenidos para el gen *Ehtom1*. B) Valores obtenidos para el gen *Ehvps23*. Los resultados muestran 2 réplicas biológicas, cada una con su réplica instrumental.

## IX. Discusión

El parásito *E. histolytica* es el agente causal de la amibiasis, que en la actualidad sigue causando alrededor de 100, 000 muertes al año en todo el mundo, esto, principalmente en países en vías de desarrollo como México. En general, el proceso por el cual los trofozoítos de *E. histolytica* producen daño en el epitelio del colon se divide en tres fases: adhesión, citólisis y fagocitosis (Faust *et al.*, 2011). El proceso que comúnmente es llamado fagocitosis es un tipo especial de endocitosis, que habitualmente se define como el mecanismo por el cual las células eucariontes internalizan porciones de su membrana celular junto con proteínas que se encuentran embebidas en ella. El proceso de endocitosis da lugar al tráfico vesicular, en este participan una gran cantidad de moléculas, además ocurre la reorganización del citoesqueleto, proceso que permite el transporte de las partículas internalizadas en estructuras conocidas como endosomas, para que diversas moléculas puedan llegar a su destino. Los endosomas tempranos son los que se forman inicialmente, seguidos por endosomas tardíos, cuerpos multivesiculares (MVBs), y los lisosomas, donde las moléculas son finalmente degradadas (Saksena *et al.*, 2007). Los MVBs son estructuras ricas en colesterol y LBPA (ácido lisofosfatídico), estas estructuras se caracterizan por tener una gran cantidad de vesículas intraluminales (Kobayashi *et al.*, 1998), estas se forman por la acción secuencial de una serie de proteínas conocidas como complejo ESCRT (complejo de direccionamiento endosomal requeridos para transporte).

En *E. histolytica* se han logrado identificar estructuras similares a MVBs derivados de fagosomas aislados (Okada *et al.*, 2006) y dentro de trofozoítos en condiciones basales (Bañuelos *et al.*, 2012); lo que sugiere que la formación de MVB en la amiba se lleva a cabo durante el proceso de fagocitosis de la amiba. Al realizar un análisis *in silico* en el genoma de *E. histolytica* se encontró la presencia de 19 homólogos putativos de la maquinaria ESCRT. Además, ensayos de RT-PCR mostraron que por lo menos 15 de estos genes se expresan a nivel de mensajero (Lopez-Reyes *et al.* 2010).

De la totalidad de moléculas que conforman la maquinaria ESCRT, solo se han caracterizado funcionalmente a los componentes del complejo ESCRT-III (Avalos-

Padilla et al., 2015; Tesis de Doctorado; Avalos-Padilla 2016) y elementos accesorios como EhADH y EhVps4 (Bañuelos et al 2011; Lopez-Reyes et al., 2010). En este trabajo decidimos enfocarnos al estudio de las proteínas EhTom1 (asociada a la maquinaria ESCRT-0) y EhVps23 (ESCRT-I), moléculas encargadas del reconocimiento inicial de las proteínas cargo así como de iniciar el reclutamiento de los demás miembros de la maquinaria ESCRT (Curtiss et al., 2007; *Blanc et al., 2009*).

En primer lugar, se procedió a la búsqueda de las proteínas homologas de Tom1 y Vps23 en *E. histolytica*. Para lo cual se realizó un BLAST sobre las proteínas contenidas en el genoma de la ameba utilizando como base la secuencia de aminoácidos de las proteínas ya reportadas en humano y *Saccharomyces cerevisiae*, de este ensayo se encontraron como posibles homólogos a las proteínas EHI\_087590 (para Tom1) y EHI\_135460 (para vps23), posterior a esto se predijeron los dominios funcionales (Figura 4 y 6), estructura secundaria (Figura 4 y 6) y estructura terciaria (Figura 5 y 7) de estas moléculas, estos resultados se compararon con los obtenidos para las proteínas ya reportadas. Se encontró una homología baja en secuencia y la carencia de un dominio funcional en la proteína EHI\_087590 con respecto a la proteína HsTomL1, sin embargo el modelaje de la estructura terciaria mostro una alta identidad estructural entre los dominios estructurales de ambas moléculas, por lo que se consideró a la proteína EHI\_087590 como homologa a Tom1 y se le nombro EhTom1.

Para el caso de la proteína EHI\_135460 se encontró con respecto a la proteína Vps23 de humano una identidad mayor en la secuencia, pero lo referente a los dominios funcionales, estructura secundaria y estructura terciaria mostraron resultados similares para ambas proteínas. Por lo que se consideró a la proteína EHI\_135460 como homologa a Vps23 y se le nombro EhVps23.

Mediante los ensayos de clonación se logró poner a nuestros genes de interés primero en el vector de transito (Figura 10) y después en el vector de expresión (Figura 13), con lo cual se logró la inducción de las proteínas recombinantes (Figura 14) con un peso similar al predicho 57 kDa para GST-EhTom1 y 80 kDa para GST-EhVps23, al realizar ensayos para observar la solubilidad de estas proteínas

recombinantes se encontró que estas se acumulaban en su gran mayoría en cuerpos de inclusión (Figura 15 y 16), al realizar la técnica de electroelución para estas proteínas (Figura 18) se observó que para el caso de la proteína EhTom1 se logró obtener en buenas cantidades a esta proteína, sin embargo para la proteína EhVps23 la cantidad obtenida por esta técnica es mínima, dado esto deberán practicarse otras técnicas de purificación de estas proteínas, así como la utilización de otras metodologías para intentar sacar a nuestra proteína EhVps23 de los cuerpos de inclusión.

Después de la inmunización de animales con los péptidos específicos para EhTom1 y EhVps23 se observa que los sueros obtenidos reconocen a la proteína recombinante (Figura 19 y 20) con el peso molecular ya antes identificado. Con lo que se procedió a probar nuestros sueros inmunes contra extractos totales de amiba, en estos, se observó para el caso del suero dirigido contra EhTom1 la presencia de 3 bandas de reconocimiento de 114, 73 y 60 kDa, siendo estas específicas ya que no se muestran bandas de reconocimiento en el suero preinmune. El peso predicho tomando en cuenta la secuencia de aminoácidos es de 31 kDa, por lo que especulamos que posiblemente esta proteína posee diversas modificaciones postraduccionales, además, está pudiera estar acomplejada con alguna otras moléculas, ya que se ha observado que Tom1 poseen dominios de interacción a otros miembros de la maquinaria ESCRT (Puertollano 2005; Blanc et al., 2008). Finalmente se ha observado que otros miembros de la maquinaria ESCRT en amiba, tienen un corrimiento aberrante, esto debido tanto a la carga de las proteína así como la estructura (Tesis de Doctorado Avalos-Padilla, 2016), por lo que es posible que también en nuestro caso exista un corrimiento aberrante de nuestra proteína EhTom1.

Al utilizar nuestros sueros de los animales inmunizados específicamente para EhVps23 sobre extractos totales, observamos una banda de reconocimiento de alrededor de los 62 kDa, tomando en consideración solo la secuencia de la proteína se calcula un peso aproximado de 54 kDa, este aumento en el peso molecular podría ser debido igual que en el caso anterior a modificaciones postraduccionales.



Por otro lado se realizaron ensayos de RT-qPCR para identificar los posibles cambios en los niveles de expresión del mensajero en una cinética de eritrofagocitosis a tiempos cortos (0, 2, 5 y 10 m), esta solo representa los resultados condensados de dos experimentos por separado cada uno con su réplica instrumental, dado que el número de ensayos fue muy pequeño solo se pueden hacer especulaciones con respecto a los resultados. Para el gen *Ehtom1* se observa un ligero aumento en los niveles de expresión relativa desde los dos minutos de interacción sin embargo es necesario hacer más experimentos para probar si existen diferencias significativas con respecto a la expresión basal. El gen *Ehvps23* parece no tener cambios en la expresión relativa en los tiempos cortos analizados, por otro lado un análisis de RT-PCR (Lopez-Reyes et al., 2010) revelo aumentos en los niveles de mensajero después de los 5 m de interacción.

## X. Conclusiones

- Se identificó mediante análisis *in silico* a la proteína EHI\_087590 como EhTom1 y a la proteína EHI-135460 como EhVps23
- Se obtuvieron a las proteínas recombinantes GST-EhTom1 y GST-EhVps23.
- Se generaron anticuerpos específicos contra nuestras EhTom1 y EhVps23, que también reconocen a las proteínas recombinantes.
- Se encontraron tres bandas de reconocimiento en extractos totales de *E. histolytica* utilizando los anticuerpos anti-EhTom1, con los pesos de 114, 73 y 60 kDa.
- Se observan una banda de reconocimiento en extractos totales de *E. histolytica* utilizando los anticuerpos anti-EhVps23, con un peso de 62 kDa.
- Se observan la expresión del mensajero de los genes *Ehtom1* y *Ehvps23* en estado basal.

## **XI. Perspectivas**

- Cuantificar los niveles de las proteínas EhTom1 y EhVps23 en diferentes tiempos de eritrofagocitosis.
- Realizar la producción de anticuerpos específicos a partir de inmunización con las proteínas recombinantes EhTom1 y EhVps23.
- Probar la asociación de las proteínas EhTom1 y EhVps23 a otros miembros de la maquinaria ESCRT mediante inmunoprecipitación.
- Identificar el efecto del silenciamiento de las proteínas EhTom1 y EhVps23 sobre los mecanismos de virulencia como citólisis, adhesión, fagocitosis y la formación de absceso hepático amibiano.

## XII. Bibliografía

- AGROMAYOR, M., SOLER, N., CABALLE, A., KUECK, T., FREUND, S. M., ALLEN, M. D., BYCROFT, M., PERISIC, O., YE, Y., MCDONALD, B., SCHEEL, H., HOFMANN, K., NEIL, S. J., MARTIN-SERRANO, J. and WILLIAMS, R. L. (2012). The UBAP1 subunit of ESCRT-I interacts with ubiquitin via a SOUBA domain. *Structure*, 20, 414-428.
- ARROYO, R. and OROZCO, E. (1987). Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. *Mol Biochem Parasitol*, 23, 151-158.
- AVALOS-PADILLA, Y., BETANZOS, A., JAVIER-REYNA, R., GARCIA-RIVERA, G., CHAVEZ-MUNGUIA, B., LAGUNES-GUILLEN, A., ORTEGA, J. and OROZCO, E. (2015). EhVps32 Is a Vacuole-Associated Protein Involved in Pinocytosis and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog*, 11, e1005079.
- BABST, M., KATZMANN, D. J., ESTEPA-SABAL, E. J., MEERLOO, T. and EMR, S. D. (2002a). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell*, 3, 271-282.
- BABST, M., KATZMANN, D. J., SNYDER, W. B., WENDLAND, B. and EMR, S. D. (2002b). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell*, 3, 283-289.
- BABST, M., SATO, T. K., BANTA, L. M. and EMR, S. D. (1997). Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J*, 16, 1820-1831.
- BABST, M., WENDLAND, B., ESTEPA, E. J. and EMR, S. D. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J*, 17, 2982-2993.
- BANUELOS, C., GARCIA-RIVERA, G., LOPEZ-REYES, I., MENDOZA, L., GONZALEZ-ROBLES, A., HERRANZ, S., VINCENT, O. and OROZCO, E. (2012). EhADH112 is a Bro1 domain-containing protein involved in the *Entamoeba histolytica* multivesicular bodies pathway. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 28.
- BANUELOS, C., GARCIA-RIVERA, G., LOPEZ-REYES, I. and OROZCO, E. (2005). Functional characterization of EhADH112: an *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein. *Exp Parasitol*, 110, 292-297.
- BARKER, D. C. (1983). *The Biology of Entamoeba histolytica*. By Adolfo Martinez-Palomo. 161 pages. ISBN 0 471 10404 3. Research Studies Press (John Wiley) Chichester, 1982.
- Parasitology*, 87, 539-539.
- BETANZOS, A., JAVIER-REYNA, R., GARCIA-RIVERA, G., BANUELOS, C., GONZALEZ-MARISCAL, L., SCHNOOR, M. and OROZCO, E. (2013). The EhCPADH112 complex of *Entamoeba histolytica* interacts with tight junction proteins occludin and claudin-1 to produce epithelial damage. *PLoS One*, 8, 2013.
- BILODEAU, P. S., URBANOWSKI, J. L., WINISTORFER, S. C. and PIPER, R. C. (2002). The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol*, 4, 534-539.
- BILODEAU, P. S., WINISTORFER, S. C., KEARNEY, W. R., ROBERTSON, A. D. and PIPER, R. C. (2003). Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome. *J Cell Biol*, 163, 237-243.
- BLANC, C., CHARETTE, S. J., MATTEI, S., AUBRY, L., SMITH, E. W., COSSON, P. and LETOURNEUR, F. (2009). Dictyostelium Tom1 participates to an ancestral ESCRT-0 complex. *Traffic*, 10, 161-171.

- BOURA, E. and HURLEY, J. H. (2012). Structural basis for membrane targeting by the MVB12-associated beta-prism domain of the human ESCRT-I MVB12 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 1901-1906.
- BRACHA, R., KOBILER, D. and MIRELMAN, D. (1982). Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun*, 36, 396-406.
- BRACHA, R., NUCHAMOWITZ, Y., LEIPPE, M. and MIRELMAN, D. (1999). Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol*, 34, 463-472.
- BRETSCHER, M. S. and AGUADO-VELASCO, C. (1998). Membrane traffic during cell locomotion. *Current Opinion in Cell Biology*, 10, 537-541.
- CANO-MANCERA, R. and LOPEZ-REVILLA, R. (1987). Inhibition of the adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes by carbohydrates. *Parasitol Res*, 74, 18-22.
- CDC (2015a). Amebiasis. Vol. 2015.
- CDC (2015b). Pathogen & Environment. Vol. 2015.
- CHAVEZ-MUNGÍA, B., ESPINOSA-CANTELLANO, M., CASTANON, G. and MARTÍNEZ-PALOMO, A. (2000). Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Archives of Medical Research*, 31, S165-S167.
- DAS, S. and LOHIA, A. (2002). Delinking of S phase and cytokinesis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol*, 4, 55-60.
- DIAMOND, L. S. and CLARK, C. G. (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol*, 40, 340-344.
- ESPINOSA-CANTELLANO, M. and MARTINEZ-PALOMO, A. (2000). Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev*, 13, 318-331.
- FIELD, M. C. and DACKS, J. B. (2009). First and last ancestors: reconstructing evolution of the endomembrane system with ESCRTs, vesicle coat proteins, and nuclear pore complexes. *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 4-13.
- GARCIA-RIVERA, G., ARROYO, R., MENA, R., LUNA, J. and OROZCO, E. (1997a). Involvement of the 112 kDa adhesin in *Entamoeba histolytica* phagocytosis. *Arch Med Res*, 28 Spec No, 166-167.
- GARCIA-RIVERA, G., AVILA, A., AYALA, P., ARROYO, R., RIGOTHIER, M. C. and OROZCO, E. (1997b). Identification and location of the cell-binding domain in the 112 kDa adhesin gene of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res*, 28 Spec No, 164-165.
- GARCIA-RIVERA, G., RODRIGUEZ, M. A., OCADIZ, R., MARTINEZ-LOPEZ, M. C., ARROYO, R., GONZALEZ-ROBLES, A. and OROZCO, E. (1999). *Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol Microbiol*, 33, 556-568.
- GARCIA-RIVERA, G., SANCHEZ, T., OROZCO, E. and GUARNEROS, G. (1982). [Isolation of clones of *E. histolytica* deficient in adhesion to human erythrocytes]. *Arch Invest Med (Mex)*, 13 Suppl 3, 129-136.
- GHOSH, S. K., FIELD, J., FRISARDI, M., ROSENTHAL, B., MAI, Z., ROGERS, R. and SAMUELSON, J. (1999). Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. *Infect Immun*, 67, 3073-3081.
- GILL, D. J., TEO, H., SUN, J., PERISIC, O., VEPRINTSEV, D. B., EMR, S. D. and WILLIAMS, R. L. (2007). Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J*, 26, 600-612.

- GROVES, E., DART, A. E., COVARELLI, V. and CARON, E. (2008). Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*, 65, 1957-1976.
- GRUENBERG, J. and STENMARK, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 317-323.
- GUERRANT, R. L., BRUSH, J., RAVDIN, J. I., SULLIVAN, J. A. and MANDELL, G. L. (1981). Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis*, 143, 83-93.
- HENNE, W. M., BUCHKOVICH, N. J. and EMR, S. D. (2011). The ESCRT pathway. *Dev Cell*, 21, 77-91.
- HERMAN, E. K., WALKER, G., VAN DER GIEZEN, M. and DACKS, J. B. (2011). Multivesicular bodies in the enigmatic amoeboflagellate *Breviata anathema* and the evolution of ESCRT 0. *J Cell Sci*, 124, 613-621.
- HORSTMANN, R. D., LEIPPE, M. and TANNICH, E. (1992). Host tissue destruction by *Entamoeba histolytica*: molecules mediating adhesion, cytolysis, and proteolysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87 Suppl 5, 57-60.
- HUGHES, M. A., LEE, C. W., HOLM, C. F., GHOSH, S., MILLS, A., LOCKHART, L. A., REED, S. L. and MANN, B. J. (2003). Identification of *Entamoeba histolytica* thiol-specific antioxidant as a GalNAc lectin-associated protein. *Mol Biochem Parasitol*, 127, 113-120.
- HURLEY, J. H. (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 4-11.
- HURLEY, J. H. and HANSON, P. I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 556-566.
- JACOBS, T., BRUCHHAUS, I., DANDEKAR, T., TANNICH, E. and LEIPPE, M. (1998). Isolation and molecular characterization of a surface-bound proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol Microbiol*, 27, 269-276.
- JUAREZ, P., SANCHEZ-LOPEZ, R., STOCK, R. P., OLVERA, A., RAMOS, M. A. and ALAGON, A. (2001). Characterization of the Ehrab8 gene, a marker of the late stages of the secretory pathway of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol*, 116, 223-228.
- KATZMANN, D. J., BABST, M. and EMR, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, 106, 145-155.
- KATZMANN, D. J., ODORIZZI, G. and EMR, S. D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 893-905.
- KATZMANN, D. J., STEFAN, C. J., BABST, M. and EMR, S. D. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol*, 162, 413-423.
- KEENE, W. E., HIDALGO, M. E., OROZCO, E. and MCKERROW, J. H. (1990). *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Exp Parasitol*, 71, 199-206.
- KOBILER, D. and MIRELMAN, D. (1980). Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect Immun*, 29, 221-225.
- KOMANDER, D., CLAGUE, M. J. and URBE, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 550-563.
- KOSTELANSKY, M. S., SCHLUTER, C., TAM, Y. Y., LEE, S., GHIRLANDO, R., BEACH, B., CONIBEAR, E. and HURLEY, J. H. (2007). Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell*, 129, 485-498.
- LEIPPE, M. (1999). Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa--effector molecules of primitive phagocytes. *Dev Comp Immunol*, 23, 267-279.

- LEUNG, K. F., DACKS, J. B. and FIELD, M. C. (2008). Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic*, 9, 1698-1716.
- LOFTUS, B., ANDERSON, I., DAVIES, R., ALSMARK, U. C., SAMUELSON, J., AMEDEO, P., RONCAGLIA, P., BERRIMAN, M., HIRT, R. P., MANN, B. J., NOZAKI, T., SUH, B., POP, M., DUCHENE, M., ACKERS, J., TANNICH, E., LEIPPE, M., HOFER, M., BRUCHHAUS, I., WILLHOEFT, U., BHATTACHARYA, A., CHILLINGWORTH, T., CHURCHER, C., HANCE, Z., HARRIS, B., HARRIS, D., JAGELS, K., MOULE, S., MUNGALL, K., ORMOND, D., SQUARES, R., WHITEHEAD, S., QUAIL, M. A., RABBINOWITSCH, E., NORBERTCZAK, H., PRICE, C., WANG, Z., GUILLEN, N., GILCHRIST, C., STROUP, S. E., BHATTACHARYA, S., LOHIA, A., FOSTER, P. G., SICHERITZ-PONTEN, T., WEBER, C., SINGH, U., MUKHERJEE, C., EL-SAYED, N. M., PETRI, W. A., JR., CLARK, C. G., EMBLEY, T. M., BARRELL, B., FRASER, C. M. and HALL, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature*, 433, 865-868.
- LOHIA, A. (2003). The cell cycle of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Biochem*, 253, 217-222.
- LOPEZ-REYES, I., GARCIA-RIVERA, G., BANUELOS, C., HERRANZ, S., VINCENT, O., LOPEZ-CAMARILLO, C., MARCHAT, L. A. and OROZCO, E. (2010). Detection of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport in *Entamoeba histolytica* and Characterization of the EhVps4 Protein. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 890674.
- LUHTALA, N. and ODORIZZI, G. (2004). Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol*, 166, 717-729.
- MARTINEZ-PALOMO, A., GONZALEZ-ROBLES, A., CHAVEZ, B., OROZCO, E., FERNANDEZ-CASTELO, S. and CERVANTES, A. (1985). Structural bases of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Protozool*, 32, 166-175.
- MEZA, I., CAZARES, F., ROSALES-ENCINA, J. L., TALAMAS-ROHANA, P. and ROJKIND, M. (1987). Use of antibodies to characterize a 220-kilodalton surface protein from *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis*, 156, 798-805.
- MITRA, B. N., YASUDA, T., KOBAYASHI, S., SAITO-NAKANO, Y. and NOZAKI, T. (2005). Differences in morphology of phagosomes and kinetics of acidification and degradation in phagosomes between the pathogenic *Entamoeba histolytica* and the non-pathogenic *Entamoeba dispar*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 62, 84-99.
- MORTIMER, L. and CHADEE, K. (2010). The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol*, 126, 366-380.
- MUKHERJEE, C., MAJUMDER, S. and LOHIA, A. (2009). Inter-cellular variation in DNA content of *Entamoeba histolytica* originates from temporal and spatial uncoupling of cytokinesis from the nuclear cycle. *PLoS Negl Trop Dis*, 3, 7.
- NCBI (2015). Taxonomy. Vol. 2015.
- OCADIZ-RUIZ, R., FONSECA, W., MARTINEZ, M. B., OCADIZ-QUINTANAR, R., OROZCO, E. and RODRIGUEZ, M. A. (2013). Effect of the silencing of the Ehcp112 gene on the in vitro virulence of *Entamoeba histolytica*. *Parasit Vectors*, 6, 248.
- OCADIZ, R., OROZCO, E., CARRILLO, E., QUINTAS, L. I., ORTEGA-LOPEZ, J., GARCIA-PEREZ, R. M., SANCHEZ, T., CASTILLO-JUAREZ, B. A., GARCIA-RIVERA, G. and RODRIGUEZ, M. A. (2005). EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. *Cell Microbiol*, 7, 221-232.
- OKADA, M., HUSTON, C. D., MANN, B. J., PETRI, W. A., JR., KITA, K. and NOZAKI, T. (2005). Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot Cell*, 4, 827-831.

- OKADA, M., HUSTON, C. D., OUE, M., MANN, B. J., PETRI, W. A., JR., KITA, K. and NOZAKI, T. (2006). Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Mol Biochem Parasitol*, 145, 171-183.
- OKADA, M. and NOZAKI, T. (2006). New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Arch Med Res*, 37, 244-252.
- OROZCO-OROZCO, M. E., MARTINEZ-PALOMO, A. and GUARNEROS, G. (1980). [Virulence and surface properties of various axenic strains of *Entamoeba histolytica*]. *Arch Invest Med (Mex)*, 11, 153-157.
- OROZCO, E., GUARNEROS, G., MARTINEZ-PALOMO, A. and SANCHEZ, T. (1983). *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med*, 158, 1511-1521.
- OROZCO, E., SUAREZ, M. E. and SANCHEZ, T. (1985). Differences in adhesion, phagocytosis and virulence of clones from *Entamoeba histolytica*, strain HM1:IMSS. *Int J Parasitol*, 15, 655-660.
- PETRI, W. A., JR., CHAPMAN, M. D., SNODGRASS, T., MANN, B. J., BROMAN, J. and RAVDIN, J. I. (1989). Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem*, 264, 3007-3012.
- PORNILLOS, O., ALAM, S. L., RICH, R. L., MYSZKA, D. G., DAVIS, D. R. and SUNDQUIST, W. I. (2002). Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *EMBO J*, 21, 2397-2406.
- RAIBORG, C., BACHE, K. G., MEHLUM, A., STANG, E. and STENMARK, H. (2001). Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO J*, 20, 5008-5021.
- RAIBORG, C., MALEROD, L., PEDERSEN, N. M. and STENMARK, H. (2008). Differential functions of Hrs and ESCRT proteins in endocytic membrane trafficking. *Exp Cell Res*, 314, 801-813.
- RALSTON, K. S. and PETRI, W. A. (2011). The ways of a killer: how does *Entamoeba histolytica* elicit host cell death? *Essays Biochem*, 51, 193-210.
- RAVDIN, J. I. (1986). Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. *Rev Infect Dis*, 8, 247-260.
- RAVDIN, J. I., CROFT, B. Y. and GUERRANT, R. L. (1980). Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med*, 152, 377-390.
- RAVDIN, J. I. and GUERRANT, R. L. (1981). Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J Clin Invest*, 68, 1305-1313.
- RAVDIN, J. I., PETRI, W. A., MURPHY, C. F. and SMITH, R. D. (1986). Production of mouse monoclonal antibodies which inhibit in vitro adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect Immun*, 53, 1-5.
- REED, S. L. (1992). Amebiasis: an update. *Clin Infect Dis*, 14, 385-393.
- RODRIGUEZ, M. A., HERNANDEZ, F., SANTOS, L., VALDEZ, A. and OROZCO, E. (1989). *Entamoeba histolytica*: molecules involved in the target cell-parasite relationship. *Mol Biochem Parasitol*, 37, 87-99.
- RODRIGUEZ, M. A. and OROZCO, E. (1986). Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis*, 154, 27-32.
- ROSALES-ENCINA, J. L., MEZA, I., LOPEZ-DE-LEON, A., TALAMAS-ROHANA, P. and ROJKIND, M. (1987). Isolation of a 220-kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis*, 156, 790-797.
- SAITO-NAKANO, Y., YASUDA, T., NAKADA-TSUKUI, K., LEIPPE, M. and NOZAKI, T. (2004). Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem*, 279, 49497-49507.



- SÁNCHEZ-GARAY, M. and MÚJICA-VARGAS, Y. (2009). Panorama epidemiológico de la amebiasis intestinal en México 2003-2008. *Sistema nacional de vigilancia epidemiológica*, 26, 1-4.
- SHIELDS, S. B., OESTREICH, A. J., WINISTORFER, S., NGUYEN, D., PAYNE, J. A., KATZMANN, D. J. and PIPER, R. (2009). ESCRT ubiquitin-binding domains function cooperatively during MVB cargo sorting. *J Cell Biol*, 185, 213-224.
- SLAGSVOLD, T., AASLAND, R., HIRANO, S., BACHE, K. G., RAIBORG, C., TRAMBALIOLO, D., WAKATSUKI, S. and STENMARK, H. (2005). Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J Biol Chem*, 280, 19600-19606.
- SMITH, S. S. and GUILLEN, N. (2010). Organelles and Trafficking in *Entamoeba histolytica* In *Structures and Organelles in Pathogenic Protists*, Vol. 1 (ed. de Souza, W.), pp. 150-164. London.
- STAHELIN, R. V., LONG, F., DIRAVIYAM, K., BRUZIK, K. S., MURRAY, D. and CHO, W. (2002). Phosphatidylinositol 3-phosphate induces the membrane penetration of the FYVE domains of Vps27p and Hrs. *J Biol Chem*, 277, 26379-26388.
- STUART, L. M. and EZEKOWITZ, R. A. (2005). Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*, 22, 539-550.
- SUIVE (2012). Información Epidemiológica de Morbilidad, Anuario 2011. Versión Ejecutiva. Vol. 2015.
- TAKAI, Y., SASAKI, T. and MATOZAKI, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, 81, 153-208.
- TANYUKSEL, M. and PETRI, W. A., JR. (2003). Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*, 16, 713-729.
- TEIS, D., SAKSENA, S. and EMR, S. D. (2008). Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell*, 15, 578-589.
- TEO, H., GILL, D. J., SUN, J., PERISIC, O., VEPRINTSEV, D. B., VALLIS, Y., EMR, S. D. and WILLIAMS, R. L. (2006). ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell*, 125, 99-111.
- TSUTSUMI, V., RAMIREZ-ROSALES, A., LANZ-MENDOZA, H., SHIBAYAMA, M., CHAVEZ, B., RANGEL-LOPEZ, E. and MARTINEZ-PALOMO, A. (1992). *Entamoeba histolytica*: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess production as virulence markers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 86, 170-172.
- UNAM (2015). Amebiasis. Vol. 2015.
- UNIPROT (2015). Taxonomy. Vol. 2015.
- VOIGT, H., OLIVO, J. C., SANSONETTI, P. and GUILLEN, N. (1999). Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. *J Cell Sci*, 112 ( Pt 8), 1191-1201.
- WELTER, B. H. and TEMESVARI, L. A. (2004). A unique Rab GTPase, EhRabA, of *Entamoeba histolytica*, localizes to the leading edge of motile cells. *Mol Biochem Parasitol*, 135, 185-195.
- WHO (1997). Amoebiasis. *Wkly Epidemiol Rec*, 72, 97-99.
- WILLIAMS, R. L. and URBE, S. (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 355-368.
- WOLLERT, T. and HURLEY, J. H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, 464, 864-869.
- YAMAKAMI, M., YOSHIMORI, T. and YOKOSAWA, H. (2003). Tom1, a VHS domain-containing protein, interacts with tollip, ubiquitin, and clathrin. *J Biol Chem*, 278, 52865-52872.

**YOUNG, J. D., YOUNG, T. M., LU, L. P., UNKELESS, J. C. and COHN, Z. A. (1982). Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med*, 156, 1677-1690.**